

## **INFORMATION TO USERS**

**This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.**

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.**

**In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.**

**Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.**

**Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.**

**ProQuest Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600**

**UMI<sup>®</sup>**

**Université de Sherbrooke  
C.U.S.E. Fleurimont**

**RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION ET DE LA SURVIE DES  
CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES HUMAINES**

**Par  
Marie-Josée Boucher  
Département d'Anatomie et Biologie cellulaire**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)  
en Biologie cellulaire**

**1<sup>er</sup> Septembre 1999**



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**385 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**385, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

**0-612-67249-2**

**Canada**

## **TABLE DES MATIÈRES**

TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	vii
ABRÉVIATIONS.....	xi
LISTE DES PUBLICATIONS.....	xv
RÉSUMÉ.....	xvi

### **CHAPITRE I : INTRODUCTION**

1. LE PANCRÉAS.....	1
1.1. Anatomie et physiologie.....	1
1.2. Régulateurs de la croissance pancréatique <i>in vivo</i> .....	3
1.3. Régulateurs de la croissance pancréatique <i>in vitro</i> .....	6
1.4. Cancers pancréatiques.....	7
1.4.1. Épidémiologie et caractéristiques génétiques.....	7
1.4.2. Régulation négative de la prolifération des cellules pancréatiques tumorales.....	8
2. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE.....	11
2.1. Les voies des MAPKs.....	11
2.1.1. Signalisation par les p42/p44 MAPKs.....	12
2.1.2. Inactivateurs endogènes des p42/p44 MAPKs.....	20



2.1.3. Rôles des p42/p44 MAPKs.....	22
2.2. Le cycle cellulaire.....	24
2.2.1. Assemblage des complexes cycline/cdk de la phase G1.....	25
2.2.2. Les inhibiteurs du cycle cellulaire.....	29
2.2.2.1. La famille INK4.....	30
2.2.2.2. La famille Cip/Kip.....	31
2.2.3. Influence des p42/p44 MAPKs au cœur du cycle cellulaire.....	33
3. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE RÉGULATION DE L' APOPTOSE.....	35
3.1. La famille des homologues Bcl-2.....	39
3.2. Les caspases.....	43
3.3. La mitochondrie : le lien entre les homologues Bcl-2 et les caspases?.....	48
3.4. Signaux de transduction anti- et pro-apoptotiques.....	51
3.5. Relation entre prolifération et apoptose.....	56
4. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	58

## **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

1. Matériel.....	60
2. Culture cellulaire.....	61
3. Mesure de la prolifération cellulaire.....	62
3.1. Croissance clonale.....	62
3.2. Mesure de la réinitiation de la synthèse d'ADN.....	62

4. Immunobuvardage.....	63
5. Dosages enzymatiques.....	64
5.1. Dosage de l'activité cdk2.....	64
5.2. Dosage de l'activité JNK.....	65
5.3. Dosage de l'activité p38 MAPK.....	67
6. Préparation des acini pancréatiques.....	67
7. Transfections.....	69
7.1. Transfection transitoire et essai luciférase.....	69
7.2. Transfection stable.....	70
7.3. Vecteur rapporteur et vecteurs d'expression.....	71
8. Mesure de l'apoptose.....	72
8.1. Fragmentation de l'ADN.....	72
8.2. Dosage de l'activité des familles CASP-1 et CASP-3.....	73
9. Présentation des résultats.....	74

### **CHAPITRE III : RÉSULTATS**

1. Effet de l'AMPc et du TGF $\beta$ sur la prolifération des cellules pancréatiques tumorales humaine.....	75
2. Effet de l'AMPc et du TGF $\beta$ sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.....	81

3. Effet de l'AMPc et du TGF $\beta$ sur l'expression des protéines du cycle cellulaire.....	83
4. Effet de l'AMPc et du TGF $\beta$ sur l'activité cdk2 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.....	89
5. Rôle de l'inhibiteur p27 <sup>Kip1</sup> dans l'inhibition de l'activité cdk2 causée par la forskoline + IBMX dans les cellules MIA PaCa2.....	91
6. Rôle des p42/p44 MAPKs et de p27 <sup>Kip1</sup> dans l'inhibition des la prolifération des cellules PANC-1 causée par la forskoline + IBMX.....	93
7. Effet de l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les acini pancréatiques normaux.....	95
8. Effet de l'inhibition des p42/p44 MAPKs par le PD98059 sur la prolifération cellulaire des MIA PaCa-2.....	98
9. Effet d'une inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs sur la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines.....	100
10. Effet d'une inhibition des p42/p44 MAPKs sur l'activité des autres cascades MAPKs.....	104
11. Effet de l'inhibition des p42/p44 MAPKs sur l'expression des homologues Bcl-2.....	106
12. Effet du traitement des cellules MIA PaCa-2 au PD98059 sur l'activité des caspases.....	109
13. Effet d'une inhibition des cyclooxygénases sur la survie des cellules MIA PaCa-2.....	113

<b>14. Effet d'une hyperactivation des p42/p44 MAPKs sur l'apoptose induite par le PD98059.....</b>	<b>117</b>
<b>15. Effet d'une inhibition du protéasome sur les cellules MIA PaCa-2 traitées au PD98059.....</b>	<b>123</b>
<b>16. Effet de la forskoline + IBMX sur la viabilité des cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2.....</b>	<b>127</b>

## **CHAPITRE IV : DISCUSSION**

<b>1. Inhibition de la prolifération des cellules pancréatiques tumorales humaines PANC-1 et MIA PaCa-2 par l'AMPc.....</b>	<b>129</b>
<b>2. Le TGF<math>\beta</math> inhibe partiellement la prolifération des cellules PANC-1.....</b>	<b>134</b>
<b>3. Les p42/p44 MAPKs médient un signal de survie chez les cellules pancréatiques tumorales humaines.....</b>	<b>141</b>
<b>4. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>150</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>156</b>

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS**

### **CHAPITRE I : INTRODUCTION**

Figure 1. Schéma du pancréas exocrine.....	2
Figure 2. Les différents modules MAPK connus chez les mammifères.....	13
Figure 3. Activation des p42/p44 MAPKs par les récepteurs à activité tyrosine kinase et les récepteurs couplés aux protéines G.....	14
Figure 4. Régulation de la phase G1 du cycle cellulaire.....	26
Figure 5. Apoptose versus nécrose.....	37
Figure 6. Les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.....	40
Figure 7. Activation de la caspase-1 et caspase-3 par clivage.....	45

### **CHAPITRE III : RÉSULTATS**

Figure 8. Effet du TGF $\beta$ et de la forskoline + IBMX (F + I) sur la prolifération des cellules pancréatiques tumorales humaines.....	76
Figure 9. Effet du TGF $\beta$ et de la forskoline + IBMX (F + I) sur la réinitiation de la synthèse d'ADN des cellules pancréatiques tumorales humaines.....	78
Figure 10. Effet du TGF $\beta$ et de la forskoline + IBMX (F + I) sur les niveaux de phosphorylation des protéines de la famille de pRb chez les cellules pancréatiques tumorales humaines.....	80

<b>Figure 11.Effet du TGF<math>\beta</math> et de la forskoline + IBMX (F + I) sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 12.Effet du TGF<math>\beta</math> et de la forskoline + IBMX (F + I) sur l'expression des cyclines de la phase G1 du cycle cellulaire dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.....</b>	<b>84</b>
<b>Figure 13.Effet du TGF<math>\beta</math> et de la forskoline + IBMX (F + I) sur l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.....</b>	<b>86</b>
<b>Figure 14.Effet du TGF<math>\beta</math> et de la forskoline + IBMX (F + I) sur l'expression de la phosphatase cdc25A dans les cellules PANC-1.....</b>	<b>88</b>
<b>Figure 15.Effet du TGF<math>\beta</math> et de la forskoline + IBMX (F + I) sur l'activité cdk2 dans les cellules PANC-1.....</b>	<b>90</b>
<b>Figure 16.Rôle de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> dans l'inhibition de l'activité cdk2 par la forskoline + IBMX (F + I) chez les cellules MIA PaCa-2....</b>	<b>92</b>
<b>Figure 17.Rôle des p42/p44 MAPKs et de p27<sup>Kip1</sup> dans l'inhibition de la prolifération causée par la forskoline + IBMX (F + I).....</b>	<b>94</b>
<b>Figure 18.Effet de la caeruléine, de la forskoline + IBMX et de la sécrétine sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les acini pancréatiques.....</b>	<b>97</b>
<b>Figure 19.Effet du PD98059 sur la progression des cellules MIA PaCa-2 dans le cycle cellulaire.....</b>	<b>99</b>

<b>Figure 20.Effet de l'inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs sur la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines.....</b>	<b>101</b>
<b>Figure 21.Effet du niveau et de la durée de l'inhibition des p42/p44 MAPKs sur la réponse apoptotique observée dans les cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2 suite au traitement avec le PD98059.....</b>	<b>103</b>
<b>Figure 22.Effet de l'inhibition des p42/p44 MAPKs sur l'activité de la p38 MAPK et des JNKs dans les cellules MIA PaCa-2.....</b>	<b>105</b>
<b>Figure 23.Régulation de l'expression des homologues anti-apoptotiques Bcl-2 par le PD98059 dans les cellules MIA PaCa-2.....</b>	<b>107</b>
<b>Figure 24.Régulation de l'expression des homologues pro-apoptotiques Bcl-2 par le PD98059 dans les cellules MIA PaCa-2.....</b>	<b>108</b>
<b>Figure 25.Effet du traitement des cellules MIA PaCa-2 au PD98059 sur l'activité de la famille CASP-1 et CASP-3.....</b>	<b>111</b>
<b>Figure 26.Effet du PD98059 sur l'expression de la poly(ADP)-ribose polymérase (PARP) chez les cellules MIA PaCa-2.....</b>	<b>112</b>
<b>Figure 27.Effet des inhibiteurs des familles CASP-1 et CASP-3 sur la fragmentation de l'ADN observée suite au traitement des cellules MIA PaCa-2 au PD98059.....</b>	<b>114</b>
<b>Figure 28.Effet d'une inhibition des cyclooxygénases, COX-1 et COX-2, sur la viabilité des cellules MIA PaCa-2.....</b>	<b>116</b>

<b>Figure 29.Effet du SB203580 sur l'activité des p42/p44 MAPKs, sur la fragmentation de l'ADN et sur l'expression des homologues Bcl-2 dans les cellules MIA PaCa-2 traitées au PD98059.....</b>	<b>118</b>
<b>Figure 30.Effet du SB203580 sur l'activité de la famille CASP-1 et CASP-3 ainsi que sur le clivage de la PARP induits par le PD98059 dans les cellules MIA PaCa-2.....</b>	<b>120</b>
<b>Figure 31.Effet d'un mutant constitutif actif de la MEK1 sur la fragmentation de l'ADN induite par 20µM PD98059 dans les cellules MIA PaCa-2.....</b>	<b>122</b>
<b>Figure 32.Effet de l'inhibition du protéasome sur la fragmentation de l'ADN et sur l'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques dans les cellules MIA PaCa-2 traitées au PD98059.....</b>	<b>124</b>
<b>Figure 33.Effet de l'inhibition du protéasome sur l'activité de la famille CASP-1 et CASP-3 et sur l'expression de PARP dans les cellules MIA PaCa-2 traitées au PD98059.....</b>	<b>126</b>
<b>Figure 34.Effet de la forskoline + IBMX (F + I) sur la viabilité des cellules MIA PaCa-2.....</b>	<b>128</b>



## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>ADN :</b>	<b>acide déoxyribonucléique</b>
<b>AIF :</b>	<b>facteur inducteur d'apoptose (apoptosis inducing factor)</b>
<b>ARNm :</b>	<b>acide ribonucléique messenger</b>
<b>AMPc :</b>	<b>adénosine monophosphate cyclique</b>
<b>Apaf-1 :</b>	<b>facteur activateur d'apoptosis (apoptosis activating factor)</b>
<b>ATP :</b>	<b>adénosine triphosphate</b>
<b>BH :</b>	<b>domaine d'homologie à Bcl-2</b>
<b>BSA :</b>	<b>albumine de sérum bovin (bovine serum albumin)</b>
<b>°C :</b>	<b>celsius</b>
<b>CASP-1 :</b>	<b>caspase-1</b>
<b>CASP-3 :</b>	<b>caspase-3</b>
<b>CCK :</b>	<b>cholécystokinine</b>
<b>CKI :</b>	<b>inhibiteur de cycline/cdk (cyclin-kinase inhibitor)</b>
<b>DPC4 :</b>	<b>locus 4 délété dans les carcinomes pancréatiques (deleted in pancreatic carcinoma, locus 4)</b>
<b>DMEM :</b>	<b>milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (Dulbecco modified Eagle's medium)</b>
<b>DTT :</b>	<b>dithiothréitol</b>
<b>EDTA :</b>	<b>disodium éthylènediamide tétraacétique</b>
<b>EGF :</b>	<b>facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)</b>

<b>EGTA :</b>	<b>acide éthylèneglycol-bis-(<math>\beta</math>-aminoéthyléther) N,N,N',N'- tétraacétique</b>
<b>ERK :</b>	<b>kinase régulalisée par les signaux extracellulaires (extracellular- regulated kinase)</b>
<b>FADD :</b>	<b>protéine associée à Fas possédant un domaine de mort cellulaire (Fas-associated protein with death domain)</b>
<b>FBS :</b>	<b>sérum de bovin foetal (fetal bovin serum)</b>
<b>FGFb :</b>	<b>facteur de croissance fibroblastique basique (basic fibroblast growth factor)</b>
<b>GDP :</b>	<b>guanidine diphosphate</b>
<b>h :</b>	<b>heure</b>
<b>IGF :</b>	<b>facteur de croissance insulinique (insulin-like growth factor)</b>
<b>IKappaB :</b>	<b>inhibiteur de KappaB (inhibitor of kappa B)</b>
<b>IKK :</b>	<b>kinase de l'inhibiteur de KappaB (inhibitor of kappa B kinase)</b>
<b>JNK :</b>	<b>c-Jun N-terminal Kinase</b>
<b>kDa :</b>	<b>kilodalton</b>
<b>mM :</b>	<b>millimolaire</b>
<b>MAPKKK :</b>	<b>MAP kinase kinase kinase</b>
<b>MAPKK :</b>	<b>MAP kinase kinase</b>
<b>MAPK :</b>	<b>protéine kinase activée par les mitogènes (mitogen-activated protein kinase)</b>
<b>MBP :</b>	<b>protéine de la myéline basique (myelin basic protein)</b>

<b>MKP :</b>	<b>MAPK phosphatase</b>
<b>MEK :</b>	<b>kinase de la kinase régul��ris��e par les signaux extracellulaires (mitogen-extracellular kinase)</b>
<b>MEK WT :</b>	<b>MEK sauvage (wild type)</b>
<b>MEK CA :</b>	<b>mutant constitutivement actif de la MEK</b>
<b>MEK-ER :</b>	<b>mutant constitutivement actif de la MEK inductible au 4-hydroxytamoxifen</b>
<b>MEKK :</b>	<b>MEK kinase</b>
<b>min :</b>	<b>minutes</b>
<b>mL :</b>	<b>millilitres</b>
<b>NFKappaB :</b>	<b>facteur nucl��aire KappaB (nuclear factor kappaB)</b>
<b>NGF :</b>	<b>facteur de croissance neuritique (nerve growth factor)</b>
<b>NIK :</b>	<b>NFKappaB kinase</b>
<b>nM :</b>	<b>nanomolaire</b>
<b>PARP :</b>	<b>poly(ADP)-ribose polym��rase</b>
<b>PBS :</b>	<b>tampon phosphate saline (phosphate buffer saline)</b>
<b>PI3K :</b>	<b>phosphatidyl inositol-3 kinase</b>
<b>PKA :</b>	<b>prot��ine kinase A</b>
<b>PMSF :</b>	<b>fluoride de phénylméthylsulfonyl (phenylmethylsulfonyl fluoride)</b>
<b>pNpp :</b>	<b>para-nitrophényl phosphate</b>
<b>pRb :</b>	<b>protéine du rétinoblastome</b>
<b>PT :</b>	<b>permeability transition pore</b>

<b>RAIDD :</b>	<b>protéine reliant RIP et les protéines Ich-1/Ced3 et possédant un domaine de mort cellulaire (RIP-associated Ich-1/Ced-3 homologous protein with death domain)</b>
<b>RIP :</b>	<b>protéine interagissant avec le récepteur (receptor interacting protein)</b>
<b>s :</b>	<b>secondes</b>
<b>SDS :</b>	<b>sulfate de sodium dodécyl (sodium dodecyl sulfate)</b>
<b>SDS-PAGE :</b>	<b>électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS) (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)</b>
<b>TCA :</b>	<b>acide trichloroacétique</b>
<b>TGFβ :</b>	<b>facteur de croissance transformant beta (transforming growth factor beta)</b>
<b>TNF :</b>	<b>facteur de tumeur nécrosant (tumor necrosis factor)</b>
<b>TNFRI :</b>	<b>récepteur I du TNF</b>
<b>TRADD :</b>	<b>protéine associée au domaine de mort cellulaire du TNFRI (TNFRI-associated death domain protein)</b>
<b>μg :</b>	<b>microgramme</b>
<b>μM :</b>	<b>micromolaire</b>
<b>UV :</b>	<b>rayons ultraviolets</b>

## **LISTE DES PUBLICATIONS**

Boucher, M.-J., Morisset, J., Vachon, P.H., Reed, J.C., Lainé, J., et Rivard, N. (1999) Inhibition of ERK1/2 induces pancreatic tumor cell apoptosis by down-regulation of the expression of Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub>, and Bag-1 and activation of CASP-3 subfamily caspases. Soumis le 24 août à *Journal of Biochemical Chemistry*.

Rivard, N., Boucher, M.-J., Asselin, C., et L'Allemain, G. (1999) MAP kinase cascade is required for p27 down-regulation and S-phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **277**, sous presse.

Boucher, M.-J., Morisset, J., et Rivard, N. (1999) Activation of cAMP signaling mediates G1 arrest without inducing apoptosis in pancreatic tumor cells. Manuscrit en préparation.

Boucher, M.-J., Rivard, N., et Morisset, J. (1999) Anti-mitogenic actions of TGF $\beta$  in human pancreatic tumor cell line PANC-1. Manuscrit en préparation.

# **RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION ET DE LA SURVIE DES CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES HUMAINES**

Par  
Marie-Josée Boucher

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie  
cellulaire

La prolifération cellulaire est un processus hautement régulé. Jusqu'à ce jour, deux niveaux de régulation de la prolifération cellulaire ont été identifiés : la voie p42/p44 MAPKs et les protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Dans ce travail, nous avons, dans un premier temps, mis en évidence le mécanisme d'action anti-mitogénique du TGF $\beta$  et de l'AMPc chez les cellules pancréatiques tumorales humaines PANC-1 et MIA PaCa-2 en analysant leur action sur la cascade p42/p44 MAPKs et les protéines du cycle cellulaire. Nous avons démontré que le TGF $\beta$  inhibe partiellement la prolifération des cellules PANC-1 en augmentant l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p15<sup>INK4B</sup> et p21<sup>Cip1</sup>. Quant à l'AMPc, il inhibe la prolifération des deux lignées cellulaires étudiées et ce 1- en inhibant l'activité des p42/p44 MAPKs et 2- en augmentant l'expression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> qui est responsable de l'inhibition de l'activité du complexe cycline E/cdk2.

Dans un deuxième temps, nous avons clarifié le rôle des p42/p44 MAPKs chez les cellules MIA PaCa-2. Nous avons démontré que cette cascade joue un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire puisque l'inhibition de l'activité des p42/p44 MAPKs par l'inhibiteur spécifique PD98059 bloque les cellules en phase G1 du cycle cellulaire et augmente l'expression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup>. De plus, nous avons démontré que ces kinases médient un signal de survie chez les cellules MIA PaCa-2. En effet, le traitement prolongé des cellules avec le PD98059 conduit à la fragmentation de l'ADN, une caractéristique des cellules ayant entamé un processus apoptotique. La mort cellulaire programmée (ou apoptose) est contrôlée en grande partie par deux classes de protéines : les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille des homologues Bcl-2 et les caspases. Dans ce travail, nous avons établi un lien entre les p42/p44 MAPKs, les homologues Bcl-2 et les caspases. En effet, l'inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs amène une diminution de l'expression des homologues anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-X<sub>L</sub> et conduit à l'activation de la famille CASP-3. La régulation de ces homologues Bcl-2 et de cette famille de caspases semble indubitablement sous le contrôle des p42/p44 MAPKs puisque une hyperactivité de cette voie 1- augmente l'expression de ces mêmes homologues; 2- empêche la diminution d'expression de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-X<sub>L</sub> et bloque l'activation de la famille CASP-3 induite

par le PD98059; 3- et prévient l'apoptose induite par cet inhibiteur de la cascade des p42/p44 MAPKs. Finalement, ce programme apoptotique semble être dépendant du protéasome puisque l'inhibition de ce dernier bloque complètement la fragmentation de l'ADN induite par l'inhibition prolongée des p42/44 MAPKs.

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

### **1. LE PANCRÉAS**

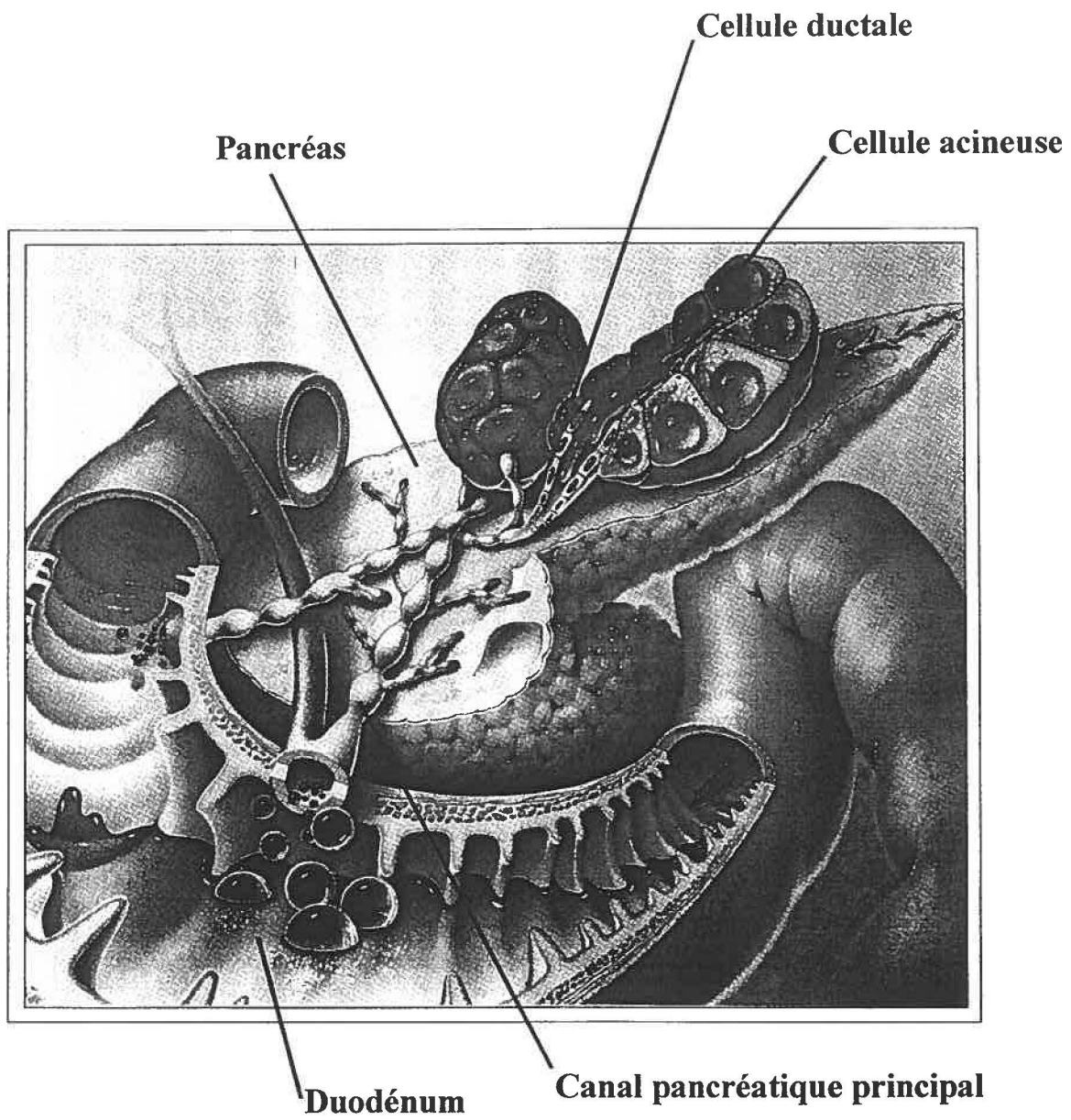
#### **1.1. Anatomie et physiologie**

Le pancréas naît d'évaginations, dorsale et ventrale, de l'intestin primitif qui, au cours du développement embryonnaire, se fusionneront pour laisser place à une seule et unique glande (Lee et Lebenthal, 1993). Unique puisque, de par ses structures particulières, elle accomplira deux fonctions très importantes. Tout d'abord, une fonction endocrine réalisée par les îlots de Langerhans. Ces derniers représentent environ 1-4 % de la masse pancréatique et sont composés de quatre principaux types cellulaires. Au centre de chacun des îlots, on retrouve les cellules  $\beta$  qui sécrètent l'insuline et au pourtour de celles-ci, les cellules  $\delta$ ,  $\alpha$  et PP sont responsables respectivement de la synthèse et de la libération de la somatostatine, du glucagon et du polypeptide pancréatique. La vascularisation importante des îlots de Langerhans lui permettra donc d'assurer son rôle majeur, celui du contrôle de la glycémie.

La deuxième grande fonction du pancréas est sous le contrôle du tissu exocrine (Rozé, 1998). Composé de cellules acineuses, de cellules ductales et de cellules centro-acineuses, le tissu exocrine représente à lui seul 90-95 % du



**Figure 1. Schéma du pancréas exocrine**  
Tiré et modifié de Rozé, 1998



volume de la glande (fig.1). Les cellules acineuses vont être responsables de la sécrétion d'enzymes digestives en réponse à la présence du chyme gastrique dans le duodénum. Les enzymes pancréatiques jouent donc un rôle essentiel dans la digestion adéquate des nutriments et, par le fait même, assurent l'absorption subséquente de ceux-ci au niveau de l'épithélium intestinal. Quant aux cellules ductales, elles s'occupent de la sécrétion hydrobicarbonatée importante 1) pour maintenir les enzymes et le mucus dans un liquide suffisamment dilué pour éviter toute précipitation, 2) pour la neutralisation de l'acidité gastrique ainsi que 3) pour maintenir, au niveau du duodénum, un pH favorable à l'activité optimale des enzymes pancréatiques. Finalement, les cellules centro-acineuses, malgré leur nom, ressemblent davantage au plan fonctionnel aux cellules ductales. Certains leur attribuent un rôle dans la sécrétion de bicarbonates (Rozé, 1998).

### 1.2. Régulateurs de la croissance pancréatique *in vivo*

En se basant sur le faible index mitotique (Opie, 1932) et sur des études autoradiographiques (Leblond et Walker, 1956), on a longtemps pensé que le pancréas adulte n'avait aucune capacité de croissance et de régénération. Cependant, depuis les premières études démontrant la faculté du pancréas de rat à augmenter son poids pancréatique suite à une stimulation à la CCK exogène (Mainz *et al.*, 1973, Barrowman et Mayston, 1974), on sait que le pancréas,

sous certaines conditions, a la faculté de croître et même de se régénérer. À noter que ce sont les cellules acineuses qui ont le plus fort pouvoir mitotique, suivi des cellules ductales, tandis que les cellules des îlots n'ont qu'un très faible potentiel de division (Elsässer *et al.*, 1993).

Parmi les hormones pouvant moduler cette croissance pancréatique, la CCK demeure le meilleur mitogène des cellules acineuses (Rivard *et al.*, 1991). Cependant, la sécrétine, la bombésine, l'EGF et la thyroxine ont tous déjà été décrits comme régulateurs positifs de la croissance pancréatique chez les rongeurs (Githens, 1993). Évidemment, aucune étude exhaustive n'a pu être réalisée sur le pancréas humain afin de confirmer ces résultats et ainsi, il n'existe, jusqu'à ce jour, aucune évidence que ce dernier est apte à croître et à se régénérer tout comme le fait le pancréas de rat. Les seules extrapolations concernant la possible capacité du pancréas humain à se régénérer repose sur une étude faite avec des porcs. En effet, le porc, de par l'expression de certains types de récepteurs (entre autres ceux de la CCK), constitue le meilleur modèle pour étudier et étendre les résultats sur le pancréas humain (Morisset *et al.*, 1996). Les auteurs démontrent que l'administration de bombésine à des porcs ayant subi une pancréatectomie permet une régénération pancréatique et une augmentation importante du taux de prolifération des cellules acineuses (Fiorucci *et al.*, 1998). De plus, soulignons une récente étude démontrant que la tête du pancréas humain grossissait suite au traitement des patients avec le

Camostate, un inhibiteur de protéases capable de bloquer l'activité des enzymes pancréatiques au niveau du duodénum (Friess *et al.*, 1998) suggérant encore une fois que le pancréas humain est apte à croître.

Une autre hormone régulatrice de la croissance pancréatique, mais cette fois-ci agissant d'une manière négative, est la somatostatine. En effet, il a été démontré que l'administration chronique de somatostatine à des rats diminuait le taux d'incorporation de thymidine tritiée *in vivo* (Morisset *et al.*, 1982). De plus, la somatostatine endogène réduit la réponse trophique amenée par la caeruleine, un analogue de la CCK, supportant ainsi l'hypothèse que la somatostatine endogène agit comme facteur anti-trophique pour le pancréas de rat (Morisset, 1984). Ces effets de la somatostatine ont été confirmés plus récemment à l'aide de l'utilisation d'un analogue plus stable de la somatostatine (octréotide ou SMS 201-995) qui a été injecté pendant 14 jours à des rats résultant en une diminution du poids pancréatique (Von Schonfeld *et al.*, 1995).

Finalement, le TGF $\beta$  a aussi été identifié comme un modulateur négatif de la croissance pancréatique *in vivo*. Une souris transgénique exprimant le TGF $\beta$ 1 dans les cellules  $\beta$ , le gène étant sous le contrôle du promoteur humain de l'insuline, démontre une diminution de l'incorporation de bromodéoxyuridine au niveau des cellules acineuses pancréatiques (Lee *et al.*,

1995). De plus, encore une fois chez la souris, l'expression d'un mutant dominant négatif du récepteur de type II du TGF $\beta$  augmente significativement la proportion des cellules acineuses progressant dans le cycle cellulaire suggérant un rôle important du TGF $\beta$  endogène dans la régulation négative de la croissance pancréatique (Bottinger *et al.*, 1997). Également, le TGF $\beta$  serait un médiateur de la régulation de la prolifération cellulaire observée suite à une pancréatite. La neutralisation du TGF $\beta$ 1 durant une pancréatite aiguë induite chez le rat accélère légèrement la régénération du pancréas (Menke *et al.*, 1997).

### 1.3. Régulateurs de la croissance pancréatique *in vitro*

Très peu d'études ont été entreprises pour confirmer l'effet des différents hormones et facteurs de croissance sur la croissance pancréatique normale *in vitro*. En effet, l'étude du pancréas exocrine fait face à deux obstacles majeurs. Tout d'abord, malgré qu'il soit possible d'isoler des acini pancréatiques, leur courte durée de vie (quelques heures) nous contraint à effectuer des expériences qu'à court terme et ainsi ne permet pas d'études exhaustives. En second lieu, il n'existe jusqu'à ce jour aucune lignée cellulaire provenant d'acini pancréatiques normaux. Les études *in vitro* se limitent donc à certaines études sur des acini isolés ou encore sur des lignées cellulaires pancréatiques tumorales qui seront discutées un peu plus loin.

Malgré ces difficultés, on a pu démontrer que la caeruléine, un analogue de la CCK, était apte à stimuler l'incorporation de thymidine tritiée chez des acini pancréatiques de souris cultivés en monocouche (Logsdon et Williams, 1986). Toujours chez la souris, mais sur des acini isolés, une étude confirme l'effet antiprolifératif du TGF $\beta$ ; le TGF $\beta$  inhibant l'incorporation de thymidine tritiée stimulée par la caeruléine, l'EGF et l'insuline (Logsdon, 1992). Finalement, il a aussi été démontré que le TGF $\beta$  inhibait l'incorporation de thymidine tritiée chez une culture de cellules épithéliales pancréatiques de rat cultivées dans 0.1% de sérum (Menke *et al.*, 1999).

#### 1.4. Cancers pancréatiques

##### 1.4.1. Épidémiologie et caractéristiques génétiques

Parmi les dix cancers les plus fréquents retrouvés chaque année, on note le cancer du pancréas qui se classe parmi les cinq cancers les plus mortels. En effet, dans la majorité des cas, quand un patient est diagnostiqué, le carcinome s'est déjà étendu dans pratiquement toute la glande et même au-delà ce qui rend les interventions médicales et chirurgicales relativement inefficaces; c'est ce qui explique le faible taux de survie d'à peine 8% observé deux ans après le diagnostic (Gold, 1995). Dans le but de prévenir, d'accélérer le diagnostic et de traiter le cancer pancréatique, des études moléculaires ont été entreprises

pour identifier les caractéristiques génétiques des adénocarcinomes pancréatiques d'origine exocrine, les adénocarcinomes d'origine endocrine étant plutôt rares. Les résultats qui se dégagent de ces études démontrent des mutations au niveau 1) de l'oncogène Ki-ras dans près de 85% des adénocarcinomes, 2) du gène suppresseur de tumeur p53 dans 50-70% des cas, 3) du gène de la CKI p16<sup>INK4A</sup> qui présente une mutation ou une délétion homozygote dans 80% des carcinomes pancréatiques et 4) du gène DPC4 (codant pour la protéine SMAD4 impliquée dans la signalisation du TGFβ) qui présente des délétions homozygotes, des mutations ou pertes de fonction dans 50% des cas de cancer pancréatique d'origine exocrine (Hahn *et al.*, 1996) et endocrine (Bartsch *et al.*, 1999). On constate que toutes ces mutations favorisent la prolifération anarchique des cellules pancréatiques; l'oncogène K-ras ayant une influence positive sur la prolifération et où les signaux d'arrêt de prolifération amenés par p53, p16<sup>INK4A</sup> et la signalisation du TGFβ sont absents.

#### 1.4.2. Régulation négative de la prolifération des cellules pancréatiques tumorales

De part ces mutations décrites dans la section précédente, les cellules pancréatiques tumorales deviennent plus résistantes aux signaux d'arrêt de prolifération. Néanmoins, certains effets inhibiteurs de la somatostatine et du



TGF $\beta$  sur la prolifération ont pu être observés sur des cellules pancréatiques tumorales.

Dans la lignée cellulaire AR4-2J (cellules pancréatiques tumorales de rat d'origine acineuse, Longnecker *et al.*, 1979), le SMS 201-995, un analogue plus stable de la somatostatine, inhibe la prolifération cellulaire induite par le sérum, l'EGF et le FGFb (Viguerie *et al.*, 1989 et Bensaid *et al.*, 1992). Chez les cellules pancréatiques tumorales humaines, le RC-160 (un autre analogue de la somatostatine) inhibe la prolifération *in vitro* des MIA PaCa-2 (Liebow *et al.*, 1989) et réduit le volume et le poids de la tumeur développée suite à la greffe des MIA PaCa-2 dans une souris nue (Radulovic *et al.*, 1993). La somatostatine inhibe également la prolifération *in vitro* et la formation de colonies sur agar des BxPC-3, une autre lignée pancréatique tumorale humaine (Takeda et Escribano, 1991). Malgré ces effets inhibiteurs de la somatostatine sur la prolifération des cellules pancréatiques tumorales, certains travaux ont plutôt rapporté une absence d'effet de celle-ci sur la prolifération de ces mêmes cellules. L'absence de récepteurs pour la somatostatine explique habituellement cette absence d'effet sur des lignées pancréatiques tumorales humaines (Gillespie *et al.*, 1992) et sur les tissus de carcinomes pancréatiques d'origine exocrine (Buscail *et al.*, 1996) et, par le fait même, la restitution de l'expression de récepteur pour la somatostatine, rétablit la réponse inhibitrice

de cette hormone sur la prolifération des cellules pancréatiques (Delesque *et al.*, 1997).

Quant au TGF $\beta$ , quelques études démontrent son effet inhibiteur sur la prolifération de cellules pancréatiques tumorales humaines. Entre autres sur les cellules COLO-357 dont la prolifération est diminuée de 50% lorsque cultivées en présence de TGF $\beta$  (Baldwin et Korc, 1993; Baldwin *et al.*, 1996; Kleeff et Korc, 1998; Kleeff *et al.*, 1999) et les PANC-1 qui peuvent être inhibées mais à un degré moindre (Baldwin et Korc, 1993; Freeman *et al.*, 1995; Baldwin *et al.*, 1996; Villanueva *et al.*, 1998). En dépit de cette régulation négative du TGF $\beta$  sur la prolifération, la plupart des études sont en faveur de défauts dans la signalisation du TGF $\beta$  qui rendent les cellules pancréatiques tumorales humaines résistantes à l'effet de cette cytokine. Des défauts qui se situent au niveau de la non-expression du récepteur de type II du TGF $\beta$  (Freeman *et al.*, 1995; Baldwin *et al.*, 1996), au niveau des protéines impliquées dans la signalisation du TGF $\beta$ , les Smads, dont l'expression peut être altérée due à une mutation comme dans le cas de Smad4 (Hahn *et al.*, 1996; Villanueva *et al.*, 1998) ou encore où l'expression peut être augmentée comme dans le cas de Smad6, un inhibiteur endogène de la signalisation du TGF $\beta$  (Kleeff *et al.*, 1999). Également, une délétion homozygote au niveau de l'exon 1 et 2 de l'inhibiteur du cycle cellulaire p15<sup>INK4B</sup> entraînant la perte d'expression de ce

dernier, déjà décrit comme un médiateur important de l'arrêt en G1 causé par un traitement au TGF $\beta$  (Hannon et Beach, 1994; Reynisdottir *et al.*, 1995; Sandhu *et al.*, 1997), a aussi été identifié comme un éventuel responsable de l'absence de réponse inhibitrice du TGF $\beta$  sur la prolifération des cellules pancréatiques tumorales humaines (Villanueva *et al.*, 1998).

## **2. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE**

La prolifération cellulaire est un processus hautement régulé. Jusqu'à ce jour, deux niveaux essentiels de régulation ont été identifiés : une régulation par la voie des p42/p44 MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) et une régulation au cœur même du cycle cellulaire.

### **2.1. Les voies des MAPKs**

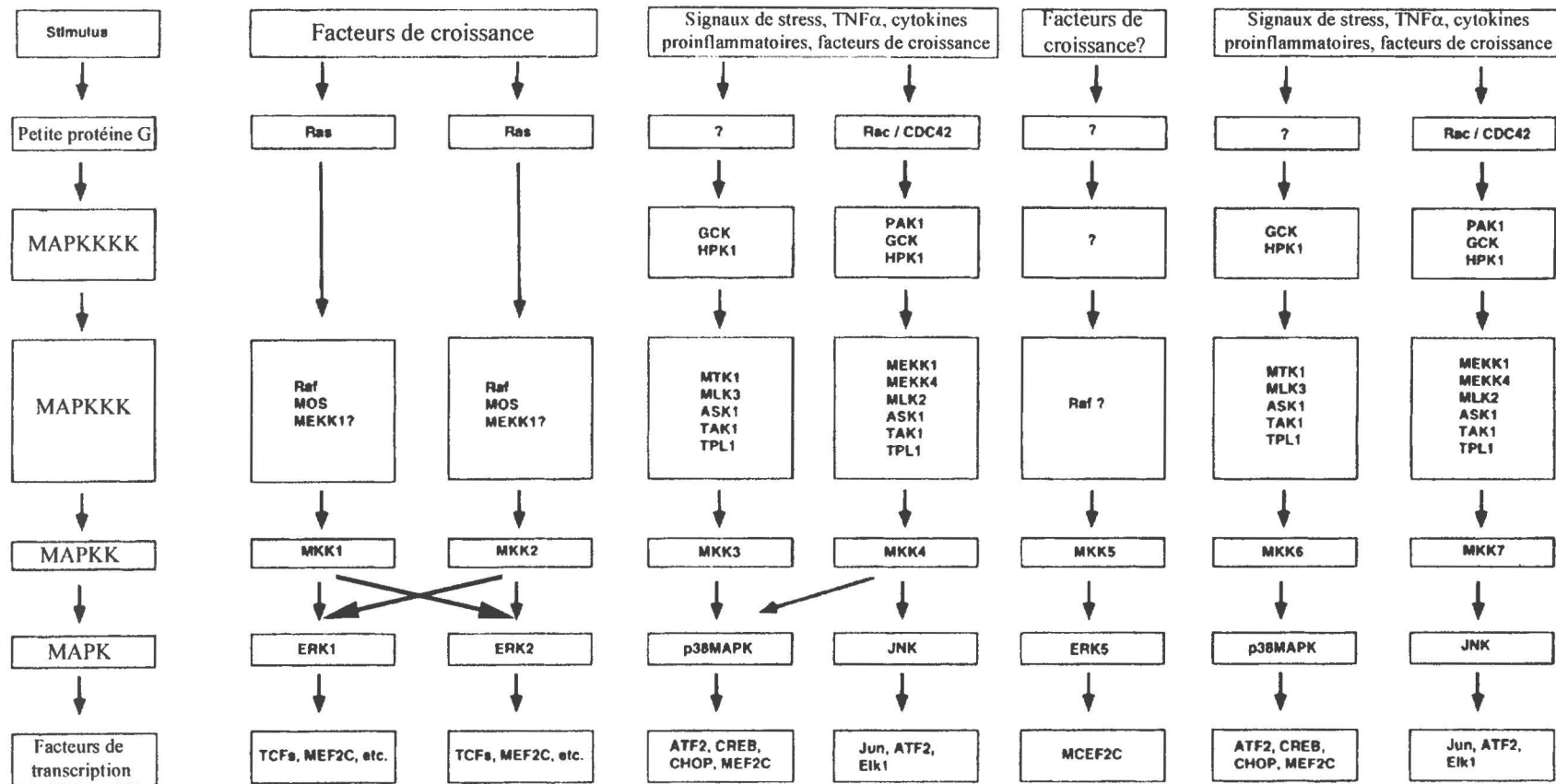
Chez les cellules de mammifères, le premier module MAPK découvert fut celui des p42/p44 MAPKs. En effet, c'est en 1987 que l'on identifie deux protéines de 42 et 44kDa dont l'activité sérine-thréonine kinase est rapidement induite dans les adipocytes 3T3-LI stimulés à l'insuline (Ray et Sturgill, 1987). Par la suite, d'autres modules MAPKs sont venus se joindre au groupe : celui de la p38 MAPK (Han *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994; Freshney *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994) et des p46/p54 JNKs (Dérjard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*,

1994). Contrairement au premier module activé préférentiellement par des hormones et facteurs de croissance, la p38 MAPK et p46/p54 JNKs sont activées par les stress environnementaux et les cytokines. Le point commun de ces modules repose sur leur cascade d'activation comprenant au moins trois kinases : une sérine/thréonine kinase (MAPKKK : MAPK kinase kinase) phosphoryle une kinase à double spécificité soit une kinase apte à phosphoryler sur résidu sérine/thréonine et tyrosine (MAPKK : MAPK kinase) qui, à son tour, active une autre sérine/thréonine kinase (MAPK). La figure 2 indique les membres des différentes cascades MAPKs connus jusqu'à présent chez les mammifères.

#### 2.1.1. Signalisation par les p42/p44 MAPKs

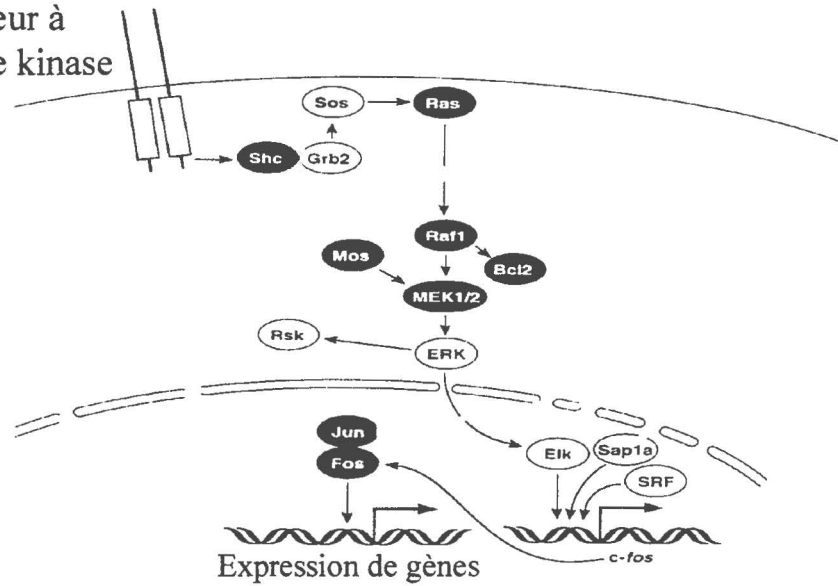
Les p42/p44 MAPK traduisent les signaux mitogéniques provenant de la liaison des facteurs de croissance et des hormones à leurs récepteurs. En effet, les récepteurs possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque et les récepteurs couplés aux protéines G vont amener, suite à leur propre stimulation, l'activation de ce module MAPK. Cependant, les voies empruntées pour la stimulation peuvent différer. La figure 3 schématise les joueurs responsables de l'activation des p42/p44 MAPKs par les récepteurs à activité tyrosine kinase et ceux couplés aux protéines G. La voie classique de stimulation des protéines ubiquistes p42/p44 MAPKs consiste en l'activation de la petite protéine G

**Figure 2. Les différents modules MAPK connus chez les mammifères**  
Traduit de Dharasekaran et Premkumar Reddy, 1998



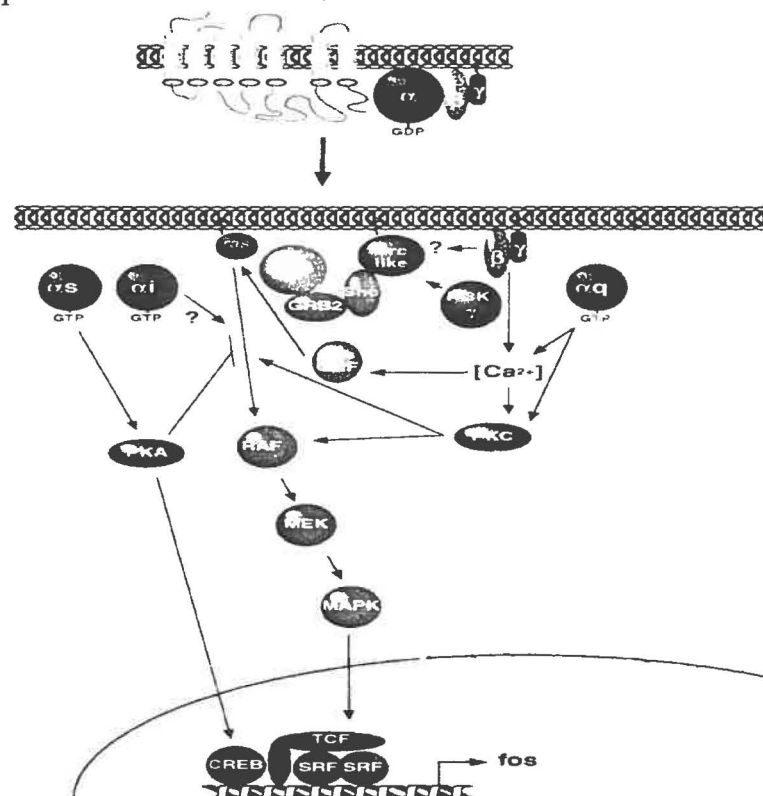
**Figure 3. Activation des p42/p44 MAPK par les récepteurs à activité tyrosine kinase (A) et les récepteurs couplés aux protéines G (B).**  
Traduits et modifiés de Hunter, 1997 (A) et Gutkind, 1998 (B)

A. Récepteur à tyrosine kinase



B.

Récepteur couplé aux protéines G Agoniste





membranaire Ras qui, dans son état liant le GTP, recrute la MAPKKK Raf à la membrane qui à son tour permettra la stimulation des MAPKK, MEK1 et MEK2, qui seront responsables de la phosphorylation sur la thréonine-183 et la tyrosine-185 des ERK1 et ERK2 (autre nom donné à la p44 MAPK et p42 MAPK respectivement), cette double phosphorylation étant essentielle à leur activité. Ces p42/p44 MAPKs activées seront responsables de la transmission du signal du cytoplasme au noyau puisqu'elles transloquent elles-mêmes au noyau pour aller directement activer des facteurs de transcription (Treisman, 1996).

La protéine Ras est une petite protéine G membranaire qui oscille entre un état inactif, sous sa forme liant le GDP, et un état actif lorsqu'elle est liée au GTP (Alberts *et al.*, 1994). Il existe 4 isoformes de la protéine Ras et chacune semble différer dans leur habileté à activer Raf-1. Une étude récente réalisée à l'aide de constitutif actif de chacune des isoformes démontre, *in vitro*, une aptitude inégale des différentes isoformes à stimuler Raf-1; Ki-Ras 4B > Ki-Ras 4A >> N-Ras > Ha-Ras (Voice *et al.*, 1999). Un autre travail, toujours effectué à l'aide de mutant constitutif actif, a déjà montré que c'était plutôt N-Ras (par rapport à Ha-Ras) qui se portait garant de l'activation de Raf-1 *in vivo* (Hamilton et Wolfman, 1998), cependant il n'avait pu comparer l'effet d'un Ki-Ras constitutif actif. Malgré ces différences, on peut tout de même imaginer que les différentes isoformes de Ras ne sont peut-être pas si redondantes dans

leur fonction et que chacune permet l'activation d'un substrat spécifique. Les études futures nous apporteront sûrement une réponse, mais pour l'instant on ne peut se baser que sur les quelques travaux à ce sujet. Les différentes PKC (conventionnelles, nouvelles et atypiques) peuvent également activer la voie p42/p44 MAPK à leur façon. Les PKC conventionnelles et nouvelles seraient aptes à stimuler Raf-1 (Schönwasser *et al.*, 1998). Cependant, contrairement à ce qui avait déjà été décrit (Kolch *et al.*, 1993), l'activation ne semble pas requérir la phosphorylation des sérine259 et sérine499, deux sites définis comme cibles de la PKC. En plus de cet effet, les PKC conventionnelles auraient un second effet qui limiterait l'activation ultérieure de Raf-1 par des facteurs de croissance et autres activateurs de PKC i.e. que l'ajout de sérum ne potentialise pas l'effet du TPA sur l'activation de Raf-1 lorsqu'ajouté simultanément suggérant un phénomène de désensibilisation opéré par les PKC conventionnelles (Schönwasser *et al.*, 1998). Quant aux PKC atypiques, elles activeraient la voie, mais plutôt au niveau de MEK; soit directement (Diaz-Meco *et al.*, 1994) ou indirectement via une protéine encore non-identifiée (Schönwasser *et al.*, 1998).

Une fois recrutées à la membrane par Ras-GTP et phosphorylées par une tyrosine kinase ancrée à la membrane (Marais *et al.*, 1995), il semblerait que chacune des isoformes de Raf (A-Raf, B-Raf et c-Raf-1), les MAPKKK de la cascade, diverge également dans leur capacité à stimuler les prochains

membres de la cascade p42/p44 MAPK soit les MEK1 et MEK2 qui sont activées par phosphorylation sur la sérine218 et la sérine222 (Zheng et Guan, 1994). Encore une fois, très peu d'études ont été entreprises dans le but de répondre à la question. Toutefois, il a été observé dans une lignée cellulaire hématopoïétique que l'interleukine-3 active les isoformes A-Raf et c-Raf-1, mais seul A-Raf serait responsable de l'activité MEK observée après stimulation avec cette cytokine (Sutor *et al.*, 1999). Ces résultats viennent quelque peu en contradiction avec ce qui avait déjà été observé où les isoformes B-Raf et c-Raf-1 étaient de meilleurs activateurs de la cascade p42/p44 MAPK que l'isoforme A-Raf (Bosch *et al.*, 1997).

L'activation des p42/p44 MAPKs par les MEK1 et MEK2 est un peu plus simple que les mécanismes d'activation décrits précédemment. En effet, jusqu'à présent, les p42/p44 MAPKs sont les seuls substrats connus de MEK1 et MEK2 (Seeger *et al.*, 1992). La particularité de ces MEKs repose sur le fait qu'il s'agit de kinases à double spécificité c'est-à-dire qu'elles vont phosphoryler les résidus tyrosine et thréonine d'une séquence consensus thréonine-glutamine-tyrosine, la double phosphorylation étant essentielle à l'activité des p42/p44 MAPKs (Anderson *et al.*, 1990). Malgré que la tyrosine185 soit enfouie dans une poche hydrophobique (Zhang *et al.*, 1994a), l'interaction MEK/MAPK doit entraîner un changement de conformation augmentant l'affinité de MEK pour son substrat et exposant ainsi la

tyrosine185 qui est le premier résidu à être phosphorylé par la MEK (Haystead *et al.*, 1992).

En réponse à un stimulus mitogénique ou à un agent induisant la différenciation, on observe une translocation nucléaire des p42/p44 MAPKs qui sont les seules de la cascade à entrer dans le noyau (Chen *et al.*, 1992; Gonzalez *et al.*, 1993; Lenormand *et al.*, 1993). Comment ce phénomène se produit reste toutefois à être élucidé. Récemment, Lenormand *et al.* ont montré que l'activation des p42/p44 MAPKs était suffisante pour initier leur translocation nucléaire à l'intérieur de cinq minutes et que ce processus ne demandait pas de néosynthèse protéique. Cependant, la rétention de celles-ci au niveau du noyau nécessite 1) la synthèse de protéines servant probablement de protéines d'ancrage pour les p42/p44 MAPKs et 2) ces protéines d'ancrage semblent régulées finement via leur dégradation dans le protéasome, puisque le traitement des cellules avec un inhibiteur de protéasome, le LLnL, permet de prolonger la localisation nucléaire des p42/p44 MAPKs (Lenormand *et al.*, 1998). Ce même groupe, en s'appuyant sur une étude de Fukuda *et al.* (1997), propose un modèle où les MEKs, qui possèdent un site d'amarrage pour les p42/p44 MAPKs en leur extrémité N-terminale (Bardwell *et al.*, 1996) et un signal d'exportation nucléaire (Fukuda *et al.*, 1996), serviraient d'ancrage cytoplasmique pour les p42/p44 MAPKs. Suite à une stimulation mitogénique,

il y aurait phosphorylation et dissociation de ces dernières des MEKs et elles pourraient alors transloquer au noyau par simple diffusion. Un autre modèle suggère que la phosphorylation des p42/p44 MAPKs est suffisante pour induire la translocation (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Ces p42/p44 MAPKs pourraient s'homodimériser entre p42/p44 MAPKs phosphorylées ou non-phosphorylées et cette dimérisation entraînerait l'accumulation nucléaire de ces kinases. Cela pourrait expliquer 1) pourquoi des mutants incapables de se dimériser ne transloquent plus au noyau, 2) pourquoi des mutants inactifs de p44 MAPK sont toujours aptes à une translocation nucléaire et 3) pourrait également expliquer les différentes cinétiques d'activation en fonction du temps, degré d'activation et efficacité des p42/p44 MAPKs à activer leurs substrats selon le stimulus. Cependant, ce modèle repose sur des études de microinjection des p42/p44 MAPKs dans des fibroblastes, nécessitant donc la validation du phénomène *in vivo*.

Comme les p42/p44 MAPKs transloquent au noyau, la plupart de leurs substrats sont nucléaires. Cependant, avant de transloquer, celles-ci peuvent phosphoryler des protéines associées à la membrane comme le récepteur à l'EGF (Northwood *et al.*, 1991) ou des protéines cytoplasmiques comme la phospholipase A2 (Lin *et al.*, 1993) et la p90<sup>RSK</sup> (Blenis, 1993). Au niveau du noyau, les cibles des p42/p44 MAPKs sont les facteurs de transcription Elk1/TCF (Gille *et al.*, 1992; Janknecht *et al.*, 1993; Marais *et al.*, 1993; Gille

*et al.*, 1995), SAP1a (Price *et al.*, 1995; Janknecht *et al.*, 1995), c-Ets1 et c-Ets2 (Yang *et al.*, 1996), c-Fos (Chen *et al.*, 1993; Okazaki et Sagata, 1995), c-Myc (Seth *et al.*, 1992) et récemment ERF, un répresseur transcriptionnel ubiquiste de la famille des facteurs de transcription Ets, s'est avéré être associé et phosphorylé par les p42/p44 MAPKs *in vitro* et *in vivo* (Le Gallic *et al.*, 1999).

### 2.1.2. Inactivateurs endogènes des p42/p44 MAPKs

Au cours des dernières années, des phosphatases ont été identifiées comme modulatrices de l'activité des différents modules MAPK. La plupart d'entre elles, phosphatases également regroupées sous le nom de MKP (MAP Kinase Phosphatases), sont rapidement induites suite à une stimulation (= immediate-early gene). MKP-1/CL100/3CH134 (Alessi *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1993) et MKP-2/hVH2/TYP1 (Guan et Butch, 1995; King *et al.*, 1995) sont des phosphatases à double spécificité (c'est-à-dire qu'elles vont déphosphoryler les résidus thréonine et tyrosine ayant été phosphorylés par la MAPKK) qui peuvent inactiver les trois classes de MAPK : p42/p44 MAPK, p38 MAPK et JNK. Leur expression est stimulée par les stress (oxydatif et thermique) ainsi que par les agents mitogéniques. Leur localisation est nucléaire et contrairement à MKP-1, MKP-2 n'est pas exprimée dans les cellules fibroblastiques humaines. B23/hVH3 (Ishibashi *et al.*, 1994) et PAC-1 (Rohan

*et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1994) sont également des phosphatases à double spécificité localisées dans le noyau, mais dont l'action est dirigée préférentiellement envers les p42/p44 MAPKs. B23/hVH3 est détectée dans plusieurs tissus normaux humains, mais plus intensément au niveau du pancréas et du cerveau. Son expression peut être stimulée par les chocs thermiques ou les mitogènes. Quant à PAC-1, elle est également induite par les agents mitogéniques, mais elle est exclusivement retrouvée dans les cellules hématopoïétiques. hVH5 (Martell *et al.*, 1995) est une tyrosine-phosphatase spécifique aux p42/p44 MAPKs (vérifier car Muda *et al.* JBC 1998 dit que JNK=p38>>>ERK) abondante au niveau du cerveau, du cœur et du muscle squelettique. Dans les cellules PC12, son expression est stimulée par le NGF et l'insuline.

Il existe une autre catégorie de MKP qui diffère de celles mentionnées ci-haut de part leur expression constitutive (donc non-inductible) et de part leur localisation cytoplasmique. Il s'agit de MKP-3/Pyst1 (Groom *et al.*, 1996) et MKP-X/Pyst2 (Dowd *et al.*, 1998) qui ont une spécificité envers les p42/p44 MAPKs et sont exprimées de manière ubiquiste. Un autre membre de cette famille a été cloné, MKP-4 (Muda *et al.*, 1997), et se distingue des deux autres par un marquage surtout au niveau du cytosol, mais également un marquage ponctuel au niveau du noyau. De plus, l'expression de cette phosphatase est

très restreinte; on la détecte seulement dans le placenta, dans les reins et dans le foie embryonnaire.

La déphosphorylation des p42/p44 MAPKs n'est pas toujours l'oeuvre de ces phosphatases venant d'être décrites. On attribue parfois l'inactivation de la voie à la PP2A (Alessi *et al.*, 1995), à une tyrosine phosphatase encore non-identifiée (Wu *et al.*, 1994; Alessi *et al.*, 1995; Gopalbhai et Meloche, 1998) ou encore aux tyrosine-phosphatases VHR (Todd *et al.*, 1999) ou à la toute nouvelle PTPBR7/PTP-SL (Ogata *et al.*, 1999) exprimée de façon prédominante dans le cerveau.

### 2.1.3. Rôles des p42/p44 MAPKs

Dans les études antérieures, il a été clairement démontré que seuls les agents mitogéniques étaient aptes à provoquer une stimulation biphasique et soutenue des p42/p44 MAPKs; un premier pic d'activation entre 5-10 minutes suivi d'une activation soutenue pouvant durer jusqu'à 6h (Kahan *et al.*, 1992; Meloche *et al.*, 1992; Vouret-Craviari *et al.*, 1993). Cette activation soutenue des p42/p44 MAPKs corrèle avec leur translocation nucléaire (Lenormand *et al.*, 1993; Lenormand *et al.*, 1998). L'utilisation de mutant dominant-négatif et d'antisens de c-Raf-1 (Kolch *et al.*, 1991), de la MEK constitutivement active (Cowley *et al.*, 1994), de p44 MAPK dominant-négatif et d'antisens de cette



même isoforme (Pagès *et al.*, 1993), ainsi que l'expression constitutive de MKP-1 (Brondello *et al.*, 1995) ont indubitablement prouvé le rôle des p42/p44 MAPKs dans la prolifération cellulaire. Bref, l'activation soutenue (Pagès *et al.*, 1993; Cowley *et al.*, 1994; Brondello *et al.*, 1995) et la translocation (Brunet *et al.*, 1999) des p42/p44 MAPKs sont des prérequis essentiels pour la prolifération cellulaire observée dans plusieurs types cellulaires (Robinson et Cobb, 1997).

En plus de son rôle majeur dans la prolifération cellulaire, les p42/p44 MAPKs semblent remplir une mission importante dans la transduction de signaux de différenciation; dans les cellules PC12, une lignée cellulaire issue de phéochromocytome de rat, l'activation des p42/p44 MAPKs est nécessaire et suffisante pour l'élongation neuritique (Cowley *et al.*, 1994; Robinson *et al.*, 1998) tandis que l'inactivation de cette cascade MAPK semble inhiber la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Cristobal Aliaga *et al.*, 1999). Également, on attribue de plus en plus un rôle de protection contre l'apoptose (mort cellulaire programmée) aux p42/p44 MAPKs (Xia *et al.*, 1995). L'activation de celles-ci par le FGF-2 protège les cellules L929 contre l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Gardner *et al.*, 1996) et leur simple inhibition suffit à entraîner les cellules HeLa dans un programme apoptotique (Berra *et al.*, 1998).

## **2.2. Le cycle cellulaire**

**Le cycle cellulaire est le processus fondamental par lequel toute espèce vivante se propage et par lequel les cellules âgées, abîmées ou mortes par apoptose sont remplacées. Il est constitué de différentes phases : G1, S, G2 et M.**

**La phase G1 est celle située entre la fin d'une mitose et le début de la phase S. Elle permet à la cellule de doubler sa masse et de dupliquer son contenu protéique. Lorsque la cellule a effectué ces changements, elle est prête à entamer la phase de synthèse d'ADN, phase S, où la cellule passe d'un contenu 2N à 4N. La dernière phase avant la mitose, phase G2, représente celle où la cellule s'assure de la réplication adéquate de l'ADN essentielle pour la subdivision égale entre les deux cellules filles issues de la mitose.**

**La phase M du cycle cellulaire consiste en deux étapes : une division nucléaire préparée et effectuée lors de la prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase, et une division cytoplasmique lors de la cytodierèse qui marque la fin de la phase M. Ainsi, au terme de cette phase, deux cellules filles au contenu 2N voient le jour.**

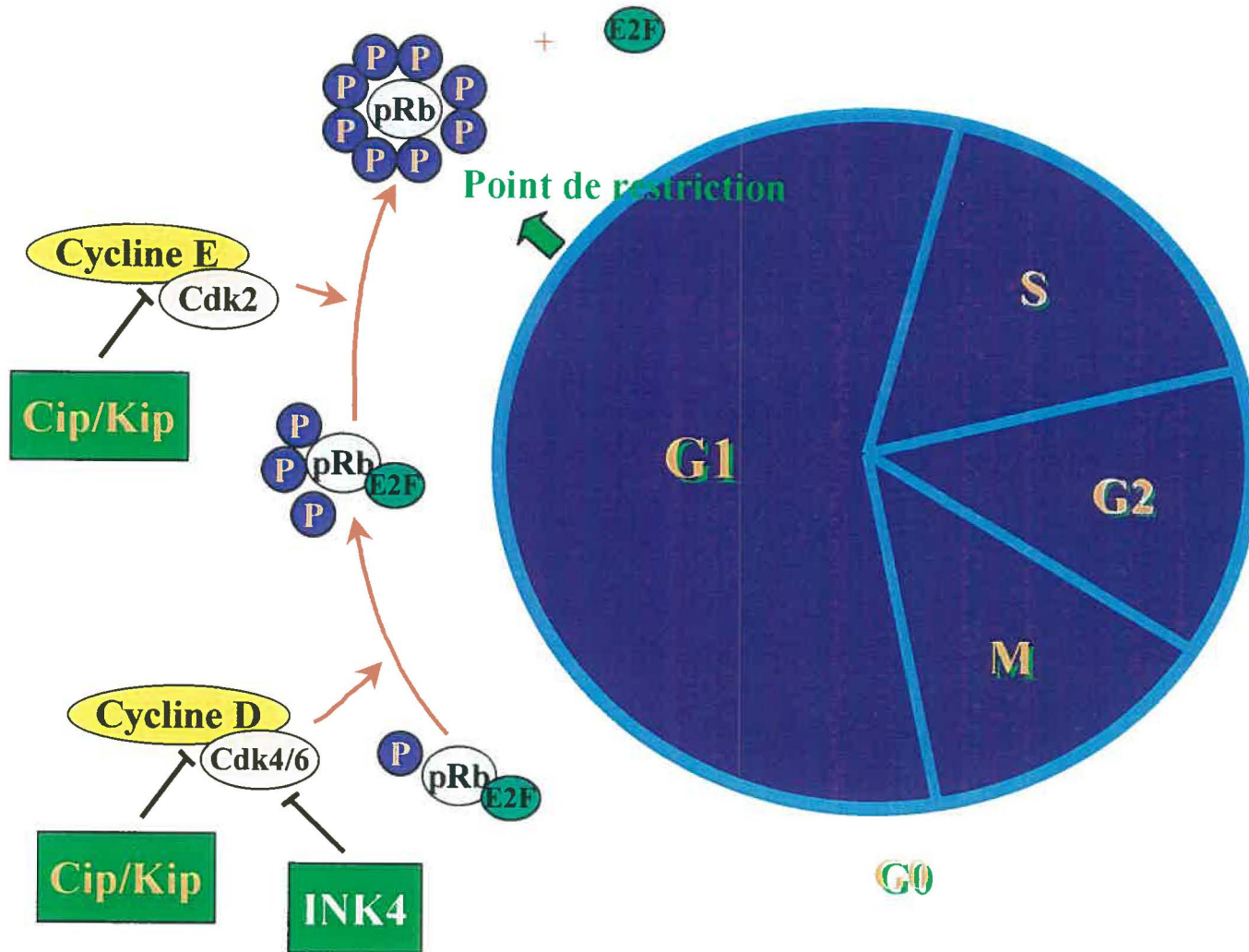
**Il peut également exister une phase G0 qui peut être empruntée par les cellules en phase G1 qui mettent un frein à leur progression dans le cycle**

cellulaire et entrent dans un état spécialisé. On surnomme cette phase état de quiescence.

### 2.2.1. Assemblage des complexes cycline/cdk de la phase G1

La phase G1 du cycle cellulaire est un épisode hautement régulé (fig.4). Cette fine régulation est accomplie en grande partie par les cyclines de la phase G1 (D1, D2, D3 et E) et leur sous-unité catalytique, les kinases dépendantes des cyclines (cdk4/cdk6 et cdk2). Suite à une stimulation mitogénique, il y a d'abord, dès la transition G0/G1 et jusqu'à la frontière G1/S, synthèse de la cycline D qui se lie avec sa sous-unité catalytique, la cdk4 ou cdk6, et cet assemblage, en plus de la phosphorylation par la kinase activatrice des cdk (CAK), permet l'activation du complexe qui débute à la mi-G1 et se poursuit jusqu'à la transition G1/S (Sherr, 1994; Matsushime *et al.*, 1994; Meyerson et Harlow, 1994; Ladha *et al.*, 1998). Ce complexe actif permet alors la progression de la phase G1 en phosphorylant la protéine du rétinoblastome, pRB, qui, dans cet état hyperphosphorylé, perd sa capacité de séquestrer les facteurs de transcription de la famille E2F qui régularisent plusieurs gènes dont les produits sont nécessaires pour la régulation des phases G1 et S du cycle cellulaire (cycline E) ou pour la réplication de l'ADN

**Figure 4. Régulation de la phase G1 du cycle cellulaire**



(dihydrofolate réductase, thymidine kinase, thymidylate synthase, histone H2A) (Nevins, 1992; Grana *et al.*, 1998). Contrairement au complexe cycline E-cdk2, pRb semble être l'unique substrat du complexe enzymatique cycline D-cdk4/6 (Sherr et Roberts, 1995). Les cyclines D sont considérées comme des senseurs d'agents mitogéniques, ce sont elles qui démarrent la machinerie du cycle cellulaire (Sherr, 1993).

Vers la fin de la phase G1 et au début de la phase S, la cycline E appuie la cycline D dans la progression du cycle (Sherr, 1993). Son expression semble contrôlée en partie par pRb. En effet, Geng *et al.* ont identifié des sites de liaison à E2F dans le promoteur de la cycline E et ont montré que ceux-ci étaient responsables de la régulation transcriptionnelle de la cycline E (1996). Dans la même année, un autre groupe de chercheurs a démontré que l'expression de cette cycline était dérégulée dans des fibroblastes issus d'embryon de souris pRb<sup>-/-</sup> : l'ARNm de la cycline E apparaissant plus tôt dans la phase G1 comparativement aux cellules pRb<sup>+/+</sup> et les niveaux protéiques étant plus élevés (Herrera *et al.*, 1996). La cycline E associée à sa sous-unité catalytique cdk2 participe elle aussi à la phosphorylation de pRb, mais aurait également d'autres substrats dont la phosphorylation est nécessaire à la synthèse d'ADN (Ohtsubo *et al.*, 1995; Resnitzky et Reed, 1995; Krude *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1998, Leone *et al.*, 1999).

Des études ont aussi démontré que la phosphorylation séquentielle de pRb par la cycline D-cdk4/6 puis par la cycline E-cdk2 était importante, puisque le complexe cycline E-cdk2 est incapable d'agir sur pRb sans sa phosphorylation préalable par le complexe cycline D-cdk4/6 (Lundberg et Weinberg, 1998). Il est important de noter que les différents complexes phosphorylent pRb sur différents sites (Connell-Crowley *et al.*, 1997; Zarkowska et Mitnacht, 1997). L'activité des deux complexes serait donc nécessaire à la phosphorylation complète de pRb qui marque le point de non-retour, ou point de restriction (point R), c'est-à-dire le point en phase G1 tardive où les cellules deviennent indépendantes des signaux mitogéniques extérieurs pour leur progression dans le cycle cellulaire (Pardee, 1989).

Suite à leur assemblage, l'activation complète des complexes cycline D-cdk4/6 et cycline E-cdk2 requiert leur phosphorylation sur un résidu thréonine (thréonine 160) par la CAK (CDK-activating kinase), qui est elle-même une enzyme composée d'une cycline, la cycline H, et de sa sous-unité catalytique, cdk7 (Fischer et Morgan, 1994). La kinase Wee1 peut quant à elle ajouter un phosphate sur un résidu tyrosine de la cdk, mais cela résulte en l'inactivation du complexe. Pour retrouver son activité, une phosphatase de la famille Cdc25 doit intervenir sur cette même tyrosine (Morgan, 1997).

Pour prouver le rôle des cyclines dans la progression de la phase G1, plusieurs études ont confirmé que la surexpression des cyclines D et E

diminuait la durée de la phase G1, diminuait le volume cellulaire et réduisait le besoin en facteurs de croissance pour la transition de la phase G1 à la phase S (Ohtsubo et Roberts, 1993; Quelle *et al.*, 1993; Resnitzky *et al.*, 1994; Resnitzky et Reed, 1995). La co-surexpression des cyclines ayant un effet additif, cela suggère également que chacune d'elle contrôle un événement différent requis pour la progression vers la phase S du cycle cellulaire (Resnitzky et Reed, 1995).

### 2.2.2. Les inhibiteurs du cycle cellulaire

Il existe quatre mécanismes gouvernant l'activité des cdk. Comme décrit dans la section précédente, le premier mécanisme repose sur la liaison de la cdk avec la cycline. Subséquemment, la complète activation survient suite à la phosphorylation par la CAK. Cependant, des kinases régulatrices tels Wee1 peuvent se mettre de la partie pour inhiber l'activité des complexes qui peut toutefois être recouvrée suite à l'action des phosphatases de la famille de Cdc25. Un dernier mécanisme de régulation repose sur l'expression d'inhibiteurs des complexes cycline-cdk (CKI : cycline-kinase inhibitor). Ces derniers sont regroupés en deux familles selon leur mode d'action et leurs cibles.



### 2.2.2.1. La famille INK4

Cette famille d'inhibiteurs est constituée de protéines de 15-20 kDa qui ont en commun la répétition, dans leur séquence, de quatre motifs ankyrin (Serrano *et al.*, 1993; Sherr, 1995). De part leur liaison aux cdk4/6, elles préviennent l'assemblage des complexes cycline D-cdk4/6 et induisent ainsi l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire (Sherr et Roberts, 1995). C'est d'ailleurs de cette fonction que la famille puise son nom : inhibiteurs de cdk4 (INK4). Les membres de cette famille sont représentés par les inhibiteurs p16<sup>INK4A</sup> (Serrano *et al.*, 1993), p15<sup>INK4B</sup> (Hannon et Beach, 1994), p18<sup>INK4C</sup> (Guan *et al.*, 1994; Hirai *et al.*, 1995) et p19<sup>INK4D</sup> (Hirai *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1995).

Malgré leur fonction commune, l'absence de redondance entre les membres pourrait s'expliquer par leur réponse à des signaux antiprolifératifs distincts. Jusqu'à présent, l'expression de p16<sup>INK4A</sup> a été associée à la sénescence; les niveaux d'expression de cet inhibiteur augmentent dramatiquement à mesure que les fibroblastes et cellules épithéliales prennent de l'âge (Alcorta *et al.*, 1996; Hara *et al.*, 1996; Reznikoff *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 1996). On a aussi suggéré un rôle de p16<sup>INK4A</sup> dans le maintien de l'intégrité du génome (Sherr, 1996). Récemment, un rôle dans l'inhibition de

la prolifération par les contacts cellule-cellule lui a également été attribué (Wieser *et al.*, 1999).

Le TGF $\beta$  est le seul inducteur connu de p15<sup>INK4B</sup> (Hannon et Beach, 1994; Reynisdottir et Massague, 1997; Sandhu *et al.*, 1997). Quant aux autres membres, un traitement des cellules Daudi avec l'interféron  $\alpha$  modifie le patron d'expression de p18<sup>INK4C</sup> (Sangfelt *et al.*, 1997), tandis que l'interleukine-6 induit l'expression des inhibiteurs p18<sup>INK4C</sup> et p19<sup>INK4D</sup> dans les cellules hématopoïétiques, ce qui corrèle avec l'arrêt en G1 et une différenciation terminale (Morse *et al.*, 1997).

#### 2.2.2.2. La famille Cip/Kip

Cette deuxième famille d'inhibiteurs a un plus large spectre d'action. Leur aptitude à bloquer l'activité des complexes cycline D-cdk4/6 et cycline E-cdk2 en font des inhibiteurs généraux regroupés sous le terme de «cdk inhibitory protein» ou encore «kinase inhibitory protein» (Cip/Kip).

Un membre de la famille à avoir été identifié est une protéine de 21kDa subséquemment nommée p21 (Cip1, Waf1, Sdi1, et Cap20 étant les autres surnoms donnés à cette même protéine) (Sherr et Roberts, 1995). Son expression est induite dans les fibroblastes durant la transition G0-G1 (Li *et al.*, 1994). Effectivement, on croit que p21 agirait comme facteur d'assemblage

pour les complexes cycline-cdk lorsqu'une seule molécule est liée au complexe, tandis que la liaison de plusieurs inhibiteurs médierait l'inactivation du complexe et ainsi l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire (Zhang *et al.*, 1994b; Sherr, 1994). L'expression de cet inhibiteur peut être contrôlée par le suppresseur de tumeur et facteur de transcription p53 (El-deiry *et al.*, 1993), ce dernier étant requis pour l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN occasionnés par les radiations ionisantes, une étape nécessaire pour la réparation de l'ADN (Kastan *et al.*, 1991; Kuerbitz *et al.*, 1992). Il apparaît d'ailleurs que c'est via p21 que p53 assure sa fonction d'inhibition de la prolifération suite à des dommages au niveau de l'ADN (Deng *et al.*, 1995). p21 a également été isolé en tant que protéine qui s'accumulait dans des fibroblastes approchant la sénescence suggérant un rôle pour cet inhibiteur dans la perte de la capacité proliférative des cellules âgées (Noda *et al.*, 1994). Finalement, une augmentation de l'expression de p21 a été observée dans des lignées cellulaires hématopoïétiques entamant un processus de différenciation (Jiang *et al.*, 1994; Steinman *et al.*, 1994).

p27 (Kip1) est un second inhibiteur de cette famille qui a été isolé à partir de lysats cellulaires bouillis (Polyak *et al.*, 1994a). Contrairement à p21, l'expression de p27 est élevée dans les cellules quiescentes et décline durant la transition G0-S (Firpo *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1994; Nourse *et al.*, 1994; Slingerland *et al.*, 1994). p27 jouerait justement un rôle dans le maintien de

l'état de quiescence (Rivard *et al.*, 1996; Ladha *et al.*, 1998). De plus, il y aurait une relation entre l'inhibition de la prolifération par contacts cellule-cellule et l'expression de cet inhibiteur (Polyak *et al.*, 1994; Levenberg *et al.*, 1999). Outre cela, p27 participe à l'inhibition de prolifération cellulaire causée par le TGF $\beta$  (Polyak *et al.*, 1994; Reynisdottir *et al.*, 1995) et des analogues ou inducteurs de l'AMPc en augmentant, dans ce dernier cas, la synthèse et en diminuant le taux de dégradation de cet inhibiteur (Kato *et al.*, 1994).

Finalement, p57 (Kip2) constitue le dernier représentant de cette famille d'inhibiteurs. Contrairement aux protéines ubiquistes p21 et p27, l'expression de p57 se limite à quelques tissus (notamment le placenta, l'intestin, le muscle squelettique, le cœur, les reins, les poumons, le pancréas et le cerveau) suggérant un rôle spécialisé de cet inhibiteur dans le contrôle du cycle cellulaire (Lee *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1995; Sherr et Roberts, 1995).

### 2.2.3. Influence des p42/p44 MAPKs au cœur du cycle cellulaire

Au cours de la section précédente, j'ai résumé les données démontrant l'importance de la voie p42/p44 MAPKs dans la prolifération cellulaire et, plus précisément, dans la transition G1-S du cycle cellulaire puisqu'elle constitue l'étape limitante de la progression du cycle. Une question survient donc à savoir quelle est la conséquence de l'activation des p42/p44 MAPKs sur les

protéines qui régularisent la phase G1 du cycle cellulaire? Comme l'expression de la cycline D1 est dépendante de la présence de facteurs de croissance et que l'activation des p42/p44 MAPKs constitue le pouvoir prolifératif des agents mitogènes, il s'avère logique de penser qu'il existe un lien étroit entre eux.

Dans des trophoblastes humains (JEG-3), l'activité du promoteur de la cycline D1 est stimulée par la surexpression de la p42 MAPK tandis qu'un mutant dominant négatif de cet isoforme réprime cet effet (Albanese *et al.*, 1995). L'expression d'un mutant dominant-négatif de la MEK1, de p44 MAPK ou la simple expression de MKP-1 bloque l'activité du promoteur de la cycline D1 ainsi que l'expression de la protéine dans les fibroblastes (CCL39) en phase exponentielle ou stimulés par du sérum 10% , tandis qu'un mutant constitutif actif de la MEK1 a l'effet inverse (Lavoie *et al.*, 1996). L'activation d'un mutant constitutif actif de la MEK1 (MEK1-ER) sous le contrôle du 4-hydroxytamoxifen, analogue de l'estradiol, dans des cellules NIH-3T3 résulte en l'induction de l'expression de la cycline D1 (Greulich et Erikson, 1998). Tous ces résultats suggèrent un rôle des p42/p44 MAPKs dans le contrôle de l'expression de la cycline D1 et ainsi, établissent un lien direct entre l'activation des p42/p44 MAPKs et la progression du cycle cellulaire.

De plus, on a déjà établi une corrélation entre ces p42/p44 MAPKs et la dégradation de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> qui survient lors de la transition G0-S. Dans les cellules NIH-3T3 exprimant MEK-ER, l'ajout de 4-hydroxytamoxifen suffit

à provoquer une baisse de l'expression de p27<sup>Kip1</sup> (Greulich et Erikson, 1998). De plus, nous avons récemment démontré que la stimulation de la cascade des p42/p44 MAPKs était nécessaire et suffisante à la diminution d'expression de p27<sup>Kip1</sup> en réponse aux facteurs de croissance et ce, dans les fibroblastes et les cellules épithéliales intestinales (Rivard *et al.*, 1999). *In vitro*, les p42/p44 MAPKs sont capables de phosphoryler p27 empêchant ce dernier de lier et d'inhiber l'activité cdk2 (Kawada *et al.*, 1997; Alessandrini *et al.*, 1997; Kerkhoff et Rapp, 1998). Malgré ces résultats, on demeure toutefois en faveur d'un rôle du complexe enzymatique cycline E-cdk2 dans la phosphorylation de p27<sup>Kip1</sup> qui est alors dirigé, après ubiquitination, vers le protéasome pour y être dégradé (Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1999).

### **3. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE RÉGULATION DE L'APOPTOSE**

La mort cellulaire programmée a initialement été décrite comme étant la mort cellulaire qui survenait en des endroits prédictifs et en des temps prédictifs au cours du développement pour ainsi mettre l'emphasis sur le fait que la mort était programmée dans le plan de développement de l'organisme (Lockshin et Williams, 1964). Aujourd'hui, quelques formes de mort cellulaire

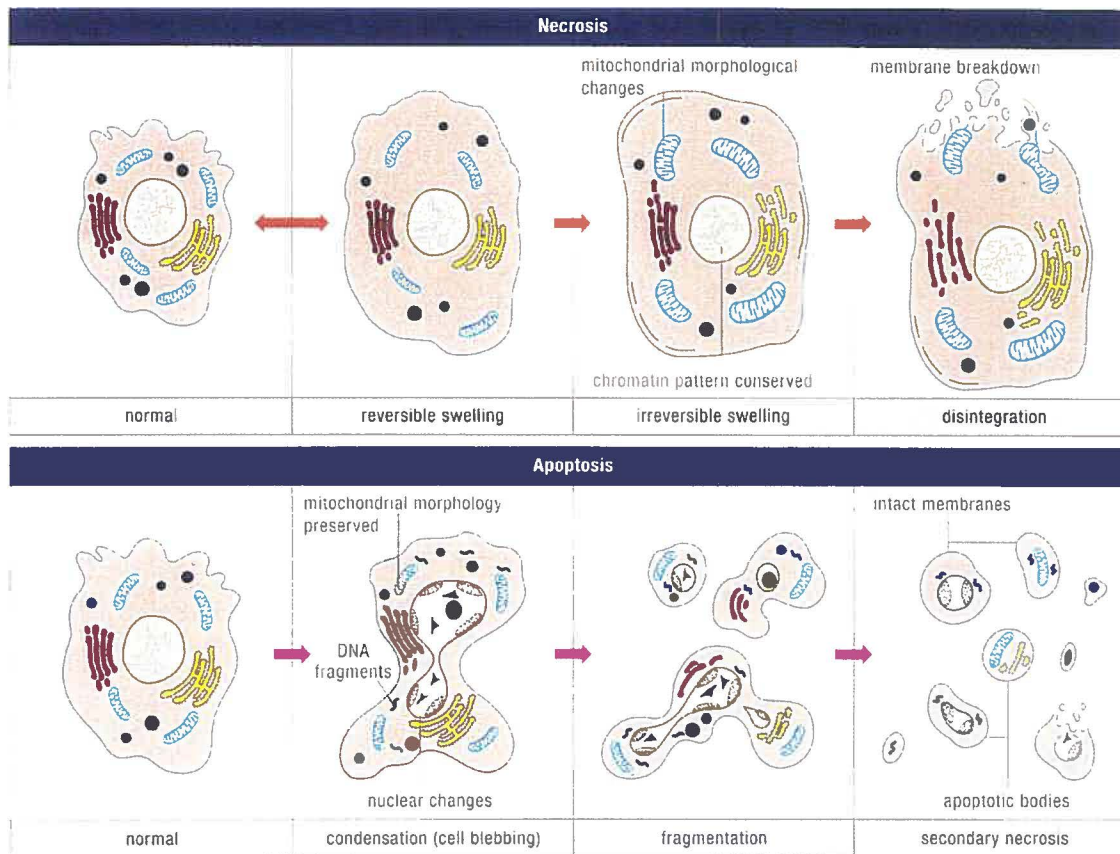
programmée ont été décrites dont la forme prédominante est l'apoptose. Celle-ci a été désignée comme un processus physiologique qui survient lorsqu'une cellule, à l'intérieur d'un organisme, meurt par un mécanisme orchestré par des protéines codées par son propre génome (Vaux et Strasser, 1996). Le but de ce processus est d'éliminer les cellules non voulues et est mis en application dans trois situations particulières : 1- dans le développement et l'homéostasie, 2- en tant que mécanisme de défense et 3- dans le vieillissement des cellules (Vaux et Strasser, 1996). L'apoptose se distingue donc d'un autre processus de mort cellulaire, la nécrose. Cette dernière met en évidence un processus pathologique qui se manifeste lorsque les cellules sont exposées à de sérieuses insultes physiques ou chimiques et s'achève avec le relâchement du contenu cytoplasmique presque intact provoquant ainsi une inflammation. Par opposition, au cours de l'apoptose, la lyse douce (relâchement du contenu cytoplasmique réduit à sa plus simple expression) n'entraîne aucune réponse inflammatoire. La figure 5 schématise les signes morphologiques distinctifs des deux types de mort cellulaire.

On peut identifier une cellule apoptotique de part ses caractéristiques morphologiques et biochimiques. Contraction cellulaire, condensation cytoplasmique, ségrégation et condensation de la chromatine, déformation de la membrane cellulaire, libération de corpuscules apoptotiques ainsi que la fragmentation internucléosomique de l'ADN sont tous des marques indiquant

**Figure 5. Apoptose versus nécrose**

Tiré et modifié de Boehringer Mannheim, Apoptosis and cell proliferation,  
1998





sans contredit le cheminement d'une cellule vers la mort cellulaire programmée (Loo et Rillema, 1998). Le processus apoptotique peut être décomposé en trois étapes : 1- une étape d'initiation qui peut être induite par de nombreux signaux létaux exogènes (carence en substances essentielles à la prolifération cellulaire), endogènes (lésions génomiques de l'ADN) ou mixtes (dans le cas des infections virales), 2- une étape d'exécution où les systèmes antagonistes d'activation ou d'inhibition des voies apoptotiques (tel celui gouverné par les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille des homologues Bcl-2) vont juger si les signaux létaux de l'étape d'initiation sont suffisants pour diriger les cellules vers un programme apoptotique, 3- si tel est le cas, ces signaux vont converger vers l'activation d'enzymes protéolytiques, les caspases, qui vont se charger des clivages protéiques et de l'induction de l'apoptose nucléaire résultant en une étape de dégradation menant à la mort cellulaire programmée qui présente les caractéristiques morphologiques et biochimiques décrites un peu plus tôt au cours de cette introduction.

Jusqu'à présent, deux classes de protéines ont été clairement décrites pour leur implication dans le processus de mort cellulaire programmée : les homologues Bcl-2 et les caspases.

### 3.1. La famille des homologues Bcl-2

Les protéines de la famille des homologues Bcl-2 (fig. 6) constituent des régulateurs centraux de la réponse apoptotique, cependant quelques signaux apoptotiques tels que ceux médiés par les cytokines de la famille du TNF peuvent contourner cette voie de régulation (Adams et Cory, 1998). Composées de membres anti- (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-w, A1) et pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bik1, Bcl-X<sub>S</sub>, Bid), ces protéines, à l'exception de Bad et Bid, de part leur séquence d'acides aminés hydrophobes en leur extrémité C-terminale, peuvent être dirigées post-traductionnellement vers les membranes mitochondriale, du réticulum endoplasmique et du noyau pour y être ancrées (Rao et White, 1997; Reed, 1998).

La dimérisation entre membres de la famille des homologues Bcl-2 est un mécanisme substantiel par lequel leur activité anti- et pro-apoptotique est contrôlée. La comparaison des séquences des homologues Bcl-2 a permis d'identifier quatre domaines conservés entre eux que l'on a par la suite désigné comme domaine d'homologie à Bcl-2 (BH) ; BH1, BH2, BH3, et BH4. La structure tertiaire adoptée par la présence des domaines BH1, BH2 et BH3 formerait une poche hydrophobe à laquelle un domaine BH3 d'un second homologue Bcl-2 peut se lier (Adams et Cory, 1998). Suite à des études de mutagenèse, ce domaine BH3 s'est avéré être crucial pour la dimérisation

**Figure 6. Les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2**  
Traduit de Reed, 1998

## Anti-apoptotiques



Bcl-2  
Bcl-X<sub>L</sub>  
Mcl-1  
Bcl-w  
CED-9



A1/Bfl-1  
Bcl-X<sub>L</sub>ΔTM

## Pro-apoptotiques



Bax  
Bak  
Bok/Mtd



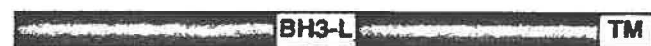
Diva



Bcl-X<sub>s</sub>



Bik/Nbk  
Hrk/Dp5  
Bim/Bod  
Blk



Nip3  
Nix/  
Bnip3L



Bad  
Bid  
EGL-1

entre homologues Bcl-2 et l'induction de l'apoptose (Kelekar et Thompson, 1998). Quant au domaine BH4, il serait requis pour l'interaction protéine-protéine entre un homologue Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>) et une seconde protéine n'appartenant pas à cette famille telle que Raf-1, R-Ras (une GTPase de 23kDa ayant 50% d'homologie avec p21Ras) et Apaf-1 (Reed, 1998). Cependant, on lui a récemment attribué un second rôle dans l'hétérodimérisation de Bcl-2 avec Bax qui serait essentiel pour la promotion de la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 (Hirotani *et al.*, 1999).

Ainsi, les membres anti-et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont aptes à former des homodimères et/ou des hétérodimères entre eux avec différentes affinités (Farrow et Brown, 1996). Cette fonction permet de titrer chacun des membres et par conséquent, le ratio entre membres anti- et pro-apoptotiques devient décisif dans la réponse de la cellule aux signaux perçus. Ce ratio peut-être régulé par 1- leur niveau d'expression protéique et 2- par épissage alternatif de l'ARNm ou de la protéine. Citons ici l'exemple de Bcl-X<sub>L</sub>, un membre anti-apoptotique de la famille des homologues Bcl-2, dont l'ARNm ou même la protéine peuvent être clivés pour laisser place à Bcl-X<sub>S</sub>, un membre pro-apoptotique.

Il existe d'autres modes de régulation de la fonction des homologues Bcl-2. Malgré que la phosphorylation de Bcl-2 ait déjà été associée à sa perte

de fonction (Chen et Faller, 1996; Halder *et al.*, 1995), une protéine Bcl-2 phosphorylée confère une résistance contre l'induction de l'apoptose dans plusieurs systèmes (Dimmeler *et al.*, 1999; Horiuchi *et al.*, 1997; Ruvolo *et al.*, 1999). À l'opposé, la phosphorylation de Bad inhibe sa fonction pro-apoptotique (Blume-Jensen *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1997; del Peso *et al.*, 1997; Scheid et Duronio, 1998; Zha *et al.*, 1996). Dans le cas du pro-apoptotique Bid, son clivage post-traductionnel lui permettrait de transloquer à la membrane mitochondriale et de se dimériser avec d'autres membres de la famille Bcl-2 (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998).

Pour prouver le rôle incontestable de ces protéines dans le contrôle de la mort cellulaire programmée soulignons le fait que la surexpression de Bcl-2 prolonge la survie cellulaire suite à des stimuli apoptotiques tels que la privation des cellules hématopoïétiques en lymphokines, le traitement des thymocytes aux glucocorticoïdes et la privation en NGF des neurones sympathiques fœtaux, alors que la suppression de l'expression de Bcl-2 induit ou accélère l'apoptose (Reed, 1994). À l'opposé, la surexpression de Bax, un membre pro-apoptotique de la famille des homologues Bcl-2, a pour effet d'accélérer la mort cellulaire en réponse à certains stimuli apoptotiques tels que la privation en facteurs de croissance, l'irradiation ou le traitement aux glucocorticoïdes chez les thymocytes (Brady *et al.*, 1996a; Oltvai *et al.*, 1993).

En plus des membres anti-apoptotiques des homologues Bcl-2, une autre protéine pourrait jouer un rôle anti-apoptotique. Il s'agit de Bag-1, tout d'abord identifiée comme une protéine liant Bcl-2, qui pourrait médier son action via sa liaison à Raf-1 qui résulte en son activation (Wang *et al.*, 1996). Une récente étude semble vouloir démontrer que Bcl-2, via son domaine BH4, lie Raf-1 pour diriger cette dernière vers la membrane mitochondriale. Par la suite, Bag-1 pourrait favoriser l'activation de cette sérine/thréonine kinase qui phosphorylerait Bad, un pro-apoptotique, pour l'inactiver et ainsi protéger la cellule contre l'apoptose (Wang et Reed, 1998).

### 3.2. Les caspases

Les caspases constituent la machinerie protéolytique de l'apoptose. Composée d'au moins 13 membres, cette famille a la particularité de cliver leurs substrats après un acide aspartique (Margolin *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1994). Les différentes caspases sont regroupées en trois sous-familles selon leur spécificité de reconnaissance de substrat : la famille de la CASP-1 qui reconnaît la séquence (WL)EHD, la famille de la CASP-3 reconnaissant la séquence DEXD et la famille de la CASP-8 reconnaissant la séquence (IVL)EXD et où X est n'importe quel acides aminés (Salvesen et Dixit, 1997). Jusqu'à présent, les substrats des caspases peuvent être regroupés en trois



catégories : les caspases, les protéines qui doivent être inactivées pour promouvoir l'apoptose et celles qui sont activées suite à leur clivage (Kidd, 1998; Salvesen et Dixit, 1997).

Les caspases sont d'abord synthétisées en tant que pro-enzymes qui sont d'abord clivées pour former un hétérodimère puis l'association de deux hétérodimères donne lieu à une enzyme hétérotétramérique active (Thornberry et Lazebnik, 1998). La figure 7 nous permet de visualiser la protéolyse qui survient et qui permet l'activation des caspase-1 (A) et -3 (B). Entre autres, ces dernières ont déjà été identifiées comme substrats de la caspase-6 (Orth *et al.*, 1996).

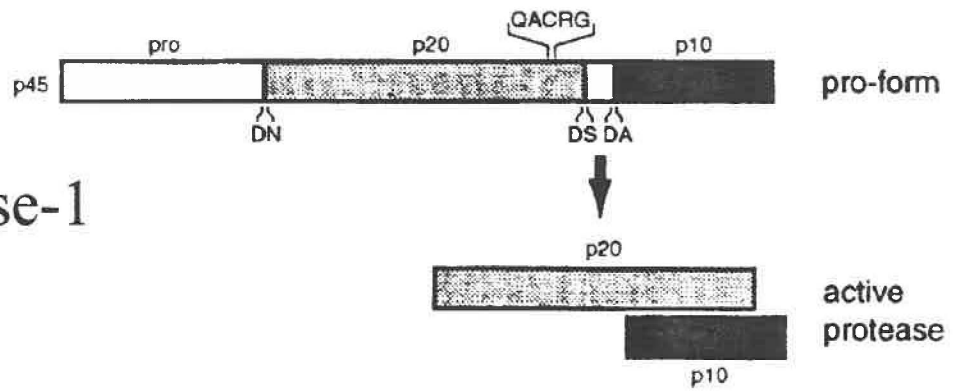
La poly(ADP)-ribose polymérase, la composante de 70kDa de la ribonucléoprotéine-U1 (U1-70K), la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK), l'inhibiteur de dissociation du GDP pour la famille de GTPases Rho (D4-GDI), pRb, la fodrine, l'actine et les lamines sont tous des substrats des caspases qui sont inactivés suite à leur clivage (Kidd, 1998). Comme on peut le constater, l'inactivation de la fonction de ces protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, dans l'épissage de l'ARNm, dans les événements cytosquelettiques, dans la progression du cycle cellulaire et dans le maintien de la forme et de l'intégrité cellulaire conduit inévitablement les cellules vers la mort cellulaire programmée.

**Figure 7. Activation des caspase-1 et caspase-3 par clivage**

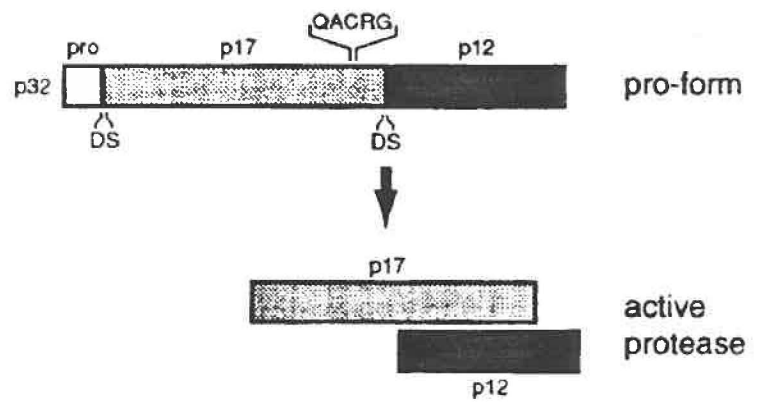
Tiré et modifié de Orth *et al.*, 1996

À noter que l'enzyme active est un hétérotétramère et non un hétérodimère  
comme indiqué à la figure

## Caspase-1



## Caspase-3



Enfin, il existe aussi des protéines dont le clivage par les caspases active leur activité intrinsèque et favorise ainsi l'apoptose. Citons dans ce dernier cas, la PKC $\delta$ , la PKC $\theta$ , la MEKK1 et l'ICAD (Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) (Kidd, 1998). Ce clivage de l'ICAD par les caspases est important puisqu'il permet de générer une CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) active responsable de la fragmentation internucléosomale de l'ADN (Porter, 1999; Thornberry et Lazebnik, 1998).

Récemment, lors d'une conférence spéciale présentée par l'American Association for Cancer Research (AACR), les fonctions des caspases ont été regroupées en trois catégories (Faivre, 1998). Les enzymes du groupe 1 (caspases 1, 4 et 5) ont une affinité pour les structures protéiques hydrophobes et jouent un rôle dans la maturation des cytokines. Le deuxième groupe composé des caspases 2, 3 et 7 constitue les principaux effecteurs de l'apoptose, tandis que les enzymes du troisième groupe (caspases 6, 8, 9 et 10) reconnaissent une séquence correspondant aux sites d'activation des proenzymes effectrices du groupe 2 ce qui leur attribue probablement un rôle d'amplification en amont de la cascade protéolytique létale.

Pour clarifier quelque peu la fonction des caspases, mentionnons la notion de caspases initiateuses (caspases 6, 8, 9 et 10) et caspases effectrices (caspases 2, 3 et 7). La pensée générale veut que différentes caspases

initiatrices médient des signaux distincts. Celles-ci seraient activées par la présence de cofacteurs nécessaires à leur activation. Par exemple, la pro-caspase-8, associée à l'apoptose induite par les cytokines de la famille du TNF, serait activée suite à sa liaison avec le co-facteur FADD (Fas-associated protein with death domain) grâce au domaine DED (death effector domain). Quant à la pro-caspase-9 surtout impliquée dans la mort induite par les agents cytotoxiques, son activation nécessiterait la présence du cofacteur APAF-1 qui lierait la pro-caspase-9 via leur domaine CARD (caspase recruitment domain) ainsi que les cofacteurs cytochrome C et le dATP (deoxyadenosine triphosphate) (Thornberry et Lazebnik, 1998). On croit que les cofacteurs serviraient à rapprocher plusieurs pro-caspases et ainsi permettre leur autoactivation protéolytique intermoléculaire. L'activation de la pro-caspase-9 sera discutée un peu plus en détail au cours de cette introduction.

Une fois les caspases initiatrices activées, celles-ci convergeront le signal vers l'activation de caspases effectrices communes. Ce modèle explique donc pourquoi des signaux apoptotiques distincts induisent des changements biochimiques et morphologiques similaires (Thornberry et Lazebnik, 1998).

### 3.3. La mitochondrie : le lien entre les homologues Bcl-2 et les caspases?

Depuis 1994, on soupçonne la mitochondrie de jouer un rôle important dans le processus d'apoptose (Zamzami *et al.*, 1994). En effet, tôt dans la mort cellulaire programmée, il y a rupture du potentiel trans-membranaire (ou transition de perméabilité) établi entre les membranes mitochondriales interne et externe. Cette transition de perméabilité a pour effet de permettre la libération de protéines intermembranaires tels que les pro-caspases -3 et -9, le facteur AIF (pour Apoptosis Inducing Factor) et le cytochrome C vers le cytoplasme en passant à travers la membrane externe via la formation d'un mégacanal protéique, le «permeability transition pore (PT)» ( Faivre, 1998; Green et Reed, 1998).

En effet, il a été démontré que des pro-caspases -3 étaient localisées dans l'espace intermembranaire des mitochondries et étaient libérées dans le cytoplasme suite à un stimulus apoptotique (Mancini *et al.*, 1998). Le phénomène semble se répéter avec la pro-caspase -9 toutefois, il reste à savoir où (dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie ou dans le cytoplasme) et comment ces pro-caspases sont activées (Green et Reed, 1998).

L'AIF (Apoptosis Inducing Factor) est une protéine de 57 kDa localisée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et qui aurait des homologies avec les oxydoréductases bactériennes. Des stimuli apoptotiques

causant l'ouverture du PT permettrait la libération de ce facteur qui transloquerait au noyau et entraînerait une condensation de la chromatine et une dégradation de l'ADN. De plus, la microinjection d'AIF dans le cytoplasme de cellules vivantes provoquerait, en plus de ces effets nucléaires, une ouverture du PT mitochondriale et permettrait la libération de la caspase-9 et du cytochrome C (Susin *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que l'AIF pourrait amplifier la cascade cytochrome C - caspase-9 - caspase-3 décrite ci-dessous (Porter, 1999).

La libération du cytochrome C dans le cytoplasme est une étape importante pour la transmission et l'amplification de plusieurs signaux apoptotiques (Liu *et al.*, 1996; Porter, 1999). Le cytochrome C et le dATP sont des cofacteurs essentiels d'APAF-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1), une protéine cytoplasmique (absente des fractions membranaires des cellules vivantes et apoptotiques) de 130kDa possédant en son extrémité C-terminale une région de 12 répétitions de 40 séquences WD nommée domaine CARD (Caspase recruitment domain) (Zou *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1999). Un modèle proposé par Zou *et al.* (1999) suggère que le dATP est nécessaire pour l'hydrolyse d'APAF-1 qui subit alors des changements de conformation et où le cytochrome C 1- permet de stabiliser cette nouvelle conformation d'APAF-1 et 2- permet la multimérisation d'au moins huit sous-unités d'APAF-1. Ce complexe (apoptosome) permet le recrutement de huit pro-caspase-9 via le

domaine CARD d'APAF-1 qui lie le domaine CARD de la pro-caspase-9. Les pro-caspase-9 seront alors activées par protéolyse et cette activation est nécessaire et suffisante pour l'activation subséquente de la pro-caspase-3 *in vitro* (Green et Reed, 1998; Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997). Pour prouver l'importance du cytochrome C dans la réponse apoptotique, mentionnons que son immunodéplétion d'extraits cellulaires bloque l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN (Liu *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997).

Finalement, il s'est avéré que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, deux membres anti-apoptotiques de la famille des homologues Bcl-2, de par leur localisation au niveau de la membrane mitochondriale, pouvaient bloquer la relâche du cytochrome C de la mitochondrie et l'activation de la caspase-3 prévenant ainsi l'apoptose (Kharbanda *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Bcl-2 a également été démontré pour bloquer l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN entraînées par la libération de l'AIF de la mitochondrie (Susin *et al.*, 1996). En plus de la régulation du PT, il existe un second mécanisme par lequel les homologues Bcl-2 pourraient bloquer l'activation de la pro-caspases-9. En effet, un complexe tertiaire composé de Bcl-X<sub>L</sub>, Apaf-1 et de la pro-caspase-9 a déjà été observé suggérant que cet homologue pouvait inhiber l'activation de la pro-caspase-9 dépendante d'APAF-1 (Hu *et al.*, 1998). Quant aux membres pro-apoptotiques tel que Bax et Bid, en s'hétérodimérisant avec Bcl-X<sub>L</sub>, empêcheraient la liaison de ce



dernier à APAF-1 et ainsi, suite à la libération du cytochrome C, permettrait la formation d'un complexe cytochrome C - APAF-1 - caspase-9 menant subséquemment à l'activation de la caspase-3 et à l'induction de l'apoptose (Pan *et al.*, 1998; Porter, 1999).

### 3.4. Signaux de transduction anti- et pro-apoptotiques

Dans la section précédente, les protéines effectrices de l'apoptose ont été décrites, mais quelles sont les voies de signalisation suffisantes et nécessaires pour diriger les cellules vers un programme apoptotique et quelles sont les voies de transduction promouvant un signal de survie?

Malgré que le mécanisme d'action ne soit pas clairement défini, de récentes évidences supportent un rôle du TGF $\beta$  non seulement dans la régulation de la prolifération mais également dans l'apoptose. En effet, le TGF $\beta$  induit l'apoptose dans plusieurs types de cellules incluant les hépatocytes et plusieurs hépatomes (Fan *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1993; Hsing *et al.*, 1996; Lin et Chou, 1995; Oberhammer *et al.*, 1992; Sanchez *et al.*, 1996). De plus, la surexpression de Smad4, une protéine impliquée dans la signalisation du TGF $\beta$ , entraîne l'apoptose des cellules MDCK (Atfi *et al.*, 1997). Cependant, les mécanismes par lesquels le TGF $\beta$  exerce son action pro-apoptotique est peu connu. Dans certains cas, on observe une diminution de

l'expression de la protéine anti-apoptique Bcl-2 (Lafon *et al.*, 1996; Selvakumaran *et al.*, 1994) suite au traitement de cellules avec le TGF $\beta$ . De plus, certaines caspases pourraient être activées en réponse au TGF $\beta$  (Chen et Chang, 1997; Choi *et al.*, 1998). Finalement, on ne peut exclure le rôle du facteur de transcription E2F-1 dans l'apoptose induite par le TGF $\beta$  puisque l'inhibition de pRb semble régulariser positivement l'apoptose induite par cette cytokine (Choi *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 1996).

Certaines cytokines de la superfamille du TNF (Tumor Necrosis Factor) comprenant entre autres le TNF $\alpha$ , FasL, CD40 et le TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), ont été associées à la mort cellulaire programmée (Nagata, 1997). L'originalité des récepteurs liant ces cytokines, plus particulièrement le récepteur I du TNF (TNFRI) et le Fas, repose sur 1- une région extracellulaire composée de 2 à 6 répétitions de domaines riches en cystéines et 2- une région cytoplasmique ayant peu de similarité mais ayant tout de même un domaine homologue qui laissait au départ présager un rôle essentiel de ce domaine dans la transmission du signal apoptotique (Nagata, 1997). Ce domaine a par la suite été identifié comme le «death domain». Suite à une stimulation par le TNF ou le FasL, les récepteurs TNFRI ou Fas vont s'oligomériser pour former un trimère (Banner *et al.*, 1994; Gruss et Dower, 1995; Smith *et al.*, 1994) permettant le recrutement d'adapteurs intracellulaires via leur «death domain». L'activation du TNFRI va ainsi permettre le

recrutement du TRADD (TNFRI-Associated Death Domain protein) tandis que l'activation du Fas va recruter le FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) aussi surnommé MORT1 (Hsu *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995). C'est grâce à leur propre «death domain» que ces adaptateurs vont pouvoir se lier au «death domain» des récepteurs actifs. L'association de FADD à TRADD constitue une voie commune de transduction du signal partagé par le TNF et le FasL (Hsu *et al.*, 1996b). La transmission du signal apoptotique pourra alors se faire via l'interaction de la caspase-8 qui mènera à l'activation d'une cascade de caspases (Ashkenazi et Dixit, 1998; Boldin *et al.*, 1996). Une autre voie apoptotique utilisée par le TNFRI est le recrutement de RIP (Receptor Interacting Protein), une sérine/thréonine kinase, par le TRADD (Hsu *et al.*, 1996a). RIP serait relié au processus apoptotique de par sa fonction de lier RAIDD (RIP-Associated Ich-1/Ced-3 homologous protein with a Death Domain) ce dernier étant utile dans le recrutement de la caspase-2 (Duan et Dixit, 1997).

Les signaux intracellulaires médiés par les récepteurs du TNF incluent également l'activation du NFKappaB (Nuclear Factor Kappa B), un facteur de transcription ubiquiste régulé par un inhibiteur cytoplasmique, la protéine IKappaB. L'activation du NFKappaB est médiée par les protéines de la famille TRAF (TNF Receptor-Associated Factor). Entre autres, TRAF2 lie indirectement TNFRI via TRADD et RIP (Nagata, 1997). Il y a alors

recrutement et activation de NIK (NFKappa B Kinase) (DiDonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997). L'activation subséquente de IKK (Inhibiteur de Kappa B Kinase) permettrait la phosphorylation de IkappaB qui serait dirigé vers le protéasome pour y être dégradé. Dès lors, NFKappa B n'est plus retenu dans le cytoplasme et peut transloquer dans le noyau pour activer la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire. En effet, un défaut dans la cascade d'activation du NFKappa B résulte en une réponse apoptotique plus prononcée suite à une stimulation des cellules avec le TNF suggérant qu'une des cibles du NFKappaB code pour un facteur de survie (Beg et Baltimore, 1996; Liu *et al.*, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Ces résultats sont en accord avec le fait que la signalisation du FasL, qui n'active pas NFKappaB, médie un signal apoptotique plus puissant que le TNF (Nagata, 1997). Comme on peut le constater, la particularité de la signalisation des cytokines de la superfamille du TNF menant à l'apoptose est indépendante d'une régulation par les membres de la famille des homologues Bcl-2 (Adams et Cory, 1998). La signalisation par ces cytokines touche directement les caspases, les protéines effectrices de l'apoptose.

Parmi les signaux pro-apoptotiques, les MAPKK3 et MAPKK6, des activateurs de la p38 MAPK, la MEKK1, un activateur des voies JNKs et p42/p44 MAPKs, la p38 MAPK et les JNKs ont toutes déjà été reliées à l'induction de l'apoptose dans certains systèmes cellulaires (Jarpe *et al.*, 1998). L'implication de la p38 MAPK et des JNKs a surtout été démontrée dans

**l'induction de l'apoptose observée suite à la privation des cellules en sérum (Ham *et al.*, 1995; Jarpe *et al.*, 1998; Le-Niculescu *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 1995). De plus, le clivage de MEKK1 par les caspases et l'activité JNK ont tous deux été associés à l'anoïkose, une forme de mort cellulaire programmée qui survient lorsque les cellules perdent les contacts qui les unissent à la matrice extracellulaire (Cardone *et al.*, 1997; Frisch *et al.*, 1996).**

**Plusieurs études ont rapporté que la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt jouait un rôle crucial dans la survie de différents types cellulaires (Jarpe *et al.*, 1998). L'activité PI3K est entre autres requise pour la survie des cellules PC12 (Yao et Cooper, 1995) et des fibroblastes (Kennedy *et al.*, 1997) privés de sérum. Dans ces exemples, le signal de survie amené par cette kinase repose exclusivement sur Akt/PKB, une sérine-thréonine kinase se trouvant en aval de la PI3K. Il est à noter que d'autres cibles de la PI3K tels que ILK (integrin-linked kinase) (Delcommenne *et al.*, 1998) et mTOR (Hosoi *et al.*, 1999) pourraient médier des signaux de survie pour les cellules. Un des mécanismes par lequel Akt/PKB pourrait médier son signal de survie est via la phosphorylation de Bad, un membre pro-apoptotique de la famille des homologues Bcl-2, qui résulte en l'inactivation de sa fonction (Franke *et al.*, 1997 a, b). À noter que Raf-1 a également été décrit pour phosphoryler Bad et ainsi protéger les cellules de la mort cellulaire programmée (Zha *et al.*, 1996).**

**L'activation des p42/p44 MAPKs peut également protéger les cellules d'un stimulus pro-apoptotique comme par exemple dans les cellules PC12**

privées de sérum (Xia *et al.*, 1995) et dans les cellules L929 traitées au TNF $\alpha$  (Gardner et Johnson, 1996). De plus, l'effet protecteur de l'IGF-I (insulin-like growth factor I) et du N-acétylcystéine dans les cellules PC12 et du VEGF (vascular endothelial growth factor) dans les cellules endothéliales microvasculaires humaines suite à la privation des cellules en sérum, implique l'activation des p42/p44 MAPKs (Gupta *et al.*, 1999; Parrizas *et al.*, 1997; Yan et Greene, 1998). Finalement, il semblerait qu'une simple inhibition des p42/p44 MAPKs serait suffisante pour entraîner les cellules vers un programme apoptotique (Berra *et al.*, 1998).

Comme on peut le constater, malgré que l'on connaisse des voies de signalisation anti-apoptotiques, le ou les mécanismes par lesquels ils agissent pour protéger la cellule contre l'induction de l'apoptose demeurent un sujet présentement étudié par plusieurs laboratoires.

### 3.5 Relation entre prolifération et apoptose

Récemment, un lien étroit entre prolifération et apoptose a été établi. En effet, il semblerait que les cellules prolifératives soit également prêtes à entrer en apoptose (Evan et Littlewood, 1998). Ce serait une façon pour la cellule de s'assurer que tous les éléments pour sa survie sont présents et si jamais ce n'est pas le cas, la mort par apoptose de la cellule prévient une duplication inadéquate de la cellule. Encore une fois, la transition de la phase G1 vers la

phase S est celle où il y aura décision entre la continuité de la progression du cycle cellulaire ou la mort par apoptose de la cellule.

Afin de démontrer les liens pouvant exister entre le cycle cellulaire et les éléments régulateurs de l'apoptose, mentionnons quelques exemples. Il a été démontré dans les thymocytes que la surexpression du pro-apoptotique Bax augmentait le nombre de cellules progressant dans le cycle cellulaire tandis que la surexpression de Bcl-2 avait l'effet inverse (Brady *et al.*, 1996b; Linette, *et al.*, 1996; Mazel *et al.*, 1996; O'Reilly *et al.*, 1996). De plus, il a été observé que la surexpression de Bcl-2 retardait l'entrée en phase S suite à la stimulation des cellules T à l'interleukin-2 (Brady *et al.*, 1996b; Linette *et al.*, 1996) à l'opposé de Bax qui, au contraire, accélèrait l'entrée des cellules en phase S (Brady *et al.*, 1996). Cet effet semble corrélér avec le niveau d'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>Kip1</sup> dont la dégradation suite à un stimulus mitogénique est retardée dans les cellules surexprimant Bcl-2 et accélérer dans les cellules exprimant Bax (Brady *et al.*, 1996b; Linette *et al.*, 1996). Plus récemment, il a été démontré que la diminution d'expression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> dans les cellules surexprimant Bax permettait une activation de cdk2, cette activation étant observée durant l'apoptose des thymocytes (Gil-Gomez *et al.*, 1998). Ces mêmes auteurs suggèrent que le rôle de cdk2 dans la mort cellulaire des thymocytes est indépendant de son rôle dans la progression du cycle cellulaire. En effet, puisque l'activation de cdk2 ne nécessitait pas l'association de ses partenaires régulatrices, les cyclines E et A, ils suggèrent

que lors de la mort cellulaire des thymocytes, cdk2 pourrait s'associer avec une protéine synthétisée *de novo* et qui permettrait l'activation de cdk2. Cette nouvelle sous-unité régulatrice de cdk2 pourrait altérer la spécificité de substrat du nouveau complexe X-cdk2 qui pourrait alors agir sur des cibles promouvant la mort cellulaire plutôt que la progression du cycle cellulaire.

Une autre étude démontre que l'activation de cdk2 générée par l'absence de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> permet aux fibroblastes de progresser dans le cycle cellulaire seulement en présence de facteurs de croissance. En effet, en absence de facteurs de croissance, l'augmentation de l'activité cdk2 médiée par l'absence de p27<sup>Kip1</sup> mène à l'apoptose des cellules (Hiromura *et al.*, 1999). Cela suggère donc que la cellule proliférative s'assure d'avoir tous les éléments nécessaires pour permettre sa division adéquate et si ce n'est pas le cas, elle empruntera le chemin menant à sa mort cellulaire.

#### **4. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE**

Mes travaux de maîtrise se sont avérés être deux projets distincts. Dans un premier temps, en partant de la première hypothèse que la somatostatine et le TGFβ médient des signaux anti-prolifératifs chez les cellules pancréatiques, le premier objectif était de regarder l'effet de ces agents sur la prolifération de deux lignées cellulaires pancréatiques tumorales humaines, les PANC-1 et les MIA PaCa-2. De plus, comme l'AMPc avait été identifié comme un puissant



agent anti-mitogénique pour la plupart des cellules, entre autres les cellules pancréatiques (Lieberman *et al.*, 1996; Ohmura *et al.*, 1993), nous avons également entrepris des études concernant son effet sur la prolifération cellulaire des PANC-1 et MIA PaCa-2. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons voulu identifier par quels mécanismes moléculaires (inhibition de la cascade p42/p44 MAPKs et/ou régulation de la progression du cycle cellulaire) le TGF $\beta$ , la somatostatine et l'AMPc agissaient pour médier leur action anti-mitogénique.

Notre deuxième hypothèse suggérait que les p42/p44 MAPKs jouaient un rôle important dans la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines. Le deuxième objectif reposait donc sur l'identification du rôle de cette cascade dans la prolifération et la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines en mettant en évidence ses effets sur les protéines régulatrices de la prolifération cellulaire (cyclines, cdks, inhibiteurs du cycle cellulaire) et de la mort cellulaire programmée (homologues Bcl-2 et caspases).

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 1. Matériel

Le TGF $\beta$  a été obtenu de R&D systems (Minneapolis, USA). La  $^3\text{H}$ -méthyl-thymidine provenait de Amersham (Oakville, Ontario). L'anticorps polyclonal dirigé contre la forme doublement phosphorylée des p42/p44 MAPKs ainsi que l'inhibiteur PD98059 ont été achetés chez New England Biolabs Inc. (Mississauga, Ontario). Les anticorps polyclonaux dirigés contre p130, la cycline D1, la cycline E, cdk2, cdc25A, p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, ainsi que les anti-Mcl-1 (Ab K-20), et Bad (Ab R-20) provenaient de chez Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Calbiochem (Mississauga, Ontario) était le fournisseur de l'inhibiteur SB203580, de l'anti-Bcl-X<sub>L</sub> (Ab PC67) ainsi que des inhibiteurs de la famille CASP-1, z-VAD-fmk, et de la famille CASP-3, z-DEVD-fmk. Les anticorps polyclonaux dirigés contre Bcl-2 (Ab 1701) (Krajewski *et al.*, 1994a), Bax (Ab 1712) (Krajewski *et al.*, 1994b), Bak (Ab 1764) (Krajewski *et al.*, 1994b) ainsi que l'anticorps monoclonal dirigé contre Bag-1 (mAb K56C8) (Takayama *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996) proviennent du laboratoire de J.C. Reed (La Jolla Cancer Research Foundation, Californie). L'anticorps monoclonal reconnaissant le fragment non-clivé de 113kDa et le fragment clivé de 89kDa de PARP était un don de G.G. Poirier

(Université Laval, Québec, Canada). L'anticorps monoclonal anti-pRb et les substrats de la famille CASP-1, Ac-YVAD-AMC, et de la famille CASP-3, Ac-DEVD-AMC, ont été obtenus de Pharmingen (Mississauga, Ontario). L'anticorps ayant servi à immunoprécipiter la p38 MAPK est un don de J. Pouyssegur (Université de Nice, France). Tous les autres produits ont été obtenus de Sigma à moins de mention contraire.

## 2. Culture cellulaire

Les lignées pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2 et PANC-1 (American Type Culture Collection) ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère humide (5% CO<sub>2</sub> , 95% air) dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium provenant de Gibco/BRL, Burlington, Ontario) contenant 10% de sérum de bovin fœtal (FBS), 2mM de glutamine et un mélange d'antibiotiques (pénicilline 100 unités/ml et streptomycine 100 µg/ml). Les cellules ont été privées en sérum dans du milieu DMEM avant le début des stimulations ou des traitements à moins de spécifications contraires mentionnées dans les protocoles concernés. Deux rinçages au PBS et un rinçage au milieu DMEM sans sérum précèdent la privation en sérum. Pour les stimulations de moins de 2h, une pré-incubation de 30 minutes avec les substances à l'étude (Forskoline + IBMX (isobutyl-méthyl-xanthine), TGFβ, PD98059, SB203580) a précédé les stimulations au sérum. Dans le cas des

traitements à long terme, les substances à l'étude et le sérum ont été ajoutés simultanément.

### **3. Mesure de la prolifération cellulaire**

#### **3.1. Croissance clonale**

Les cellules ont étéensemencées à faible confluence. Le lendemain, celles-ci ont été privées en sérum et les substances à l'étude ont été ajoutées. Au terme de cinq jours, les colonies formées ont été colorées à l'aide du bleu de Giemmsa concentré (Rivard *et al.*, 1996).

#### **3.2. Mesure de la réinitiation de la synthèse d'ADN**

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits puis, le lendemain de l'ensemencement, elles ont été mises dans du milieu DMEM exempt de sérum et ce, pour une période de 24h. Les cellules ont ensuite été stimulées avec les différentes substances à l'essai pour une période de 22h à 37°C. Durant les deux dernières heures de stimulation, 1µCi de thymidine tritiée a été ajouté à chacun des puits. À la fin du traitement, les cellules ont été rincées avec du TCA 5% froid (acide trichloroacétique) puis incubées pendant 30 minutes à 4°C dans du TCA 5%. Finalement, les cellules ont été rincées à l'eau et solubilisées à la température ambiante dans 150µL de NaOH 0.1N.

Suite à l'addition de 5ml de liquide à scintillation (Ready safe, Beckman), la radioactivité incorporée a été déterminée (Rivard *et al.*, 1996).

#### 4. Immunobuvardage

Pour les analyses d'expression des protéines du cycle cellulaire et des p42/p44 MAPKs, les cellules traitées ont été lysées dans du tampon Laemmli 1X (62.5mM Tris-HCl pH6.8, 2.3% SDS (sodium dodecyl sulfate), 10% glycérol, 1mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 0.005% bleu de bromophénol et 5% 2-β-mercaptoéthanol). Dans le cas de l'analyse de l'expression de la poly (ADP)-ribose polymérase (PARP), les cellules ont été lysées dans du tampon Laemmli 1X contenant 6M d'urée. Les lysats cellulaires ont par la suite été chauffés à 95°C pendant cinq minutes, soniqués puis réchauffés à 95°C à nouveau pour cinq minutes. Les concentrations protéiques de chacun des lysats ont été déterminées par une méthode modifiée de Lowry (Peterson, 1977). Une courbe standard a été établie avec l'albumine de sérum de bovin (BSA) effectuée en parallèle à chaque dosage. Tous les échantillons ont été dosés en duplicata. Par la suite, une quantité équivalente de protéines a été séparée par SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) puis transférée par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose. La membrane issue du transfert a été bloquée dans du PBS contenant du lait 5% à 25°C pendant 1h puis incubée avec l'anticorps primaire

contenu dans du PBS/lait 1%. Après trois lavages de 10 min dans du PBS-Tween 0.05%, la membrane a été incubée dans du PBS/lait 1% avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxidase. Finalement, suite à trois autres lavages de 10 min dans du PBS-Tween 0.05%, les protéines ayant réagi immunologiquement ont été détectées par chemiluminescence (Amersham ECL) en utilisant les films BIOMAX MR (Kodak) .

## **5. Dosages enzymatiques**

### **5.1. Dosage de l'activité cdk2**

Les cellules ont été lysées dans du tampon triton froid (1% triton X-100, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 40mM  $\beta$ -glycérophosphate, 50mM NaF, 200 $\mu$ M orthovanadate, 10% glycérol, 1 $\mu$ g/ml aprotinine, 1 $\mu$ g/ml leupeptine, 1 $\mu$ M pepstatine A, 0.1mM PMSF) puis les lysats cellulaires ont été clarifiés par centrifugation à 8 000rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les protéines ont été dosées à l'aide du réactif de BCA (Pierce). Dans un volume final de 1mL de tampon triton contenant 700 $\mu$ g de protéines des lysats totaux, 3 à 5  $\mu$ L d'anticorps Cdk2 ont été ajoutés et le tout a été placé à 4°C sous agitation pendant au moins 2h avant d'y ajouter 40 $\mu$ L de protéine-A-sépharose préalablement gonflée 1h à 4°C (gonflement de 0.1g de protéine-A-sépharose dans 1ml de tampon triton). La formation des immunocomplexes

s'est déroulée à 4°C sous agitation durant 1h. Les immunocomplexes ont par la suite été lavés avec du tampon triton. Au troisième lavage, 2/3 des immunocomplexes ont été conservés pour, par la suite, être mis sur gel de polyacrylamide afin de procéder à un immunobuvardage selon le protocole décrit à la section précédente. Le tiers restant a servi pour l'essai kinase proprement dit. Après avoir été lavés une fois dans du tampon kinase (40mM HEPES pH 7.4, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 10mM pNPP), les immunocomplexes ont été resuspendus dans 40µL de tampon kinase suppléé avec 5µg d'histone H1 (un substrat de Cdk2), 50µM d'ATP froid, 2µCi d'ATP [<sup>32</sup>P] et incubés à 30°C pour une période de 30 min. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 13.3µL de Laemmli 4X, puis les immunocomplexes ont été chauffés à 95°C durant 5 min avant d'être séparés par SDS-PAGE 12.5%. L'histone H1 phosphorylée (<sup>32</sup>P) a pu être visualisée par autoradiographie.

## 5.2. Dosage de l'activité JNK

1ml de billes de glutathion-S-sépharose a été centrifugé à 5000rpm pendant 5min à 4°C, resuspendu dans 5ml de PBS froid puis laissé sous agitation à 4°C jusqu'au lendemain matin. Pour chaque tranche de quatre échantillons, 1ml de billes pré-gonflées a été utilisé auquel on a ajouté 36µg/ml de la protéine recombinante c-jun-gst. Le tout a été laissé à la température ambiante, sous agitation, pendant 1h. Après une centrifugation de 5min à

5000rpm (4°C), les billes ayant lié c-jun-gst (dû à une réaction enzymatique entre la glutathion-S-transférase (gst) qui est couplée à c-jun et son substrat, la glutathion-S-sépharose) ont été lavées trois fois dans 10ml de PBS froid. Finalement, les billes ont été resuspendues dans (nombre d'échantillons X 100µL) de tampon triton (1% triton X-100, 50mM tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 40mM β-glycérophosphate, 50mM NaF, 200µM orthovanadate, 10% glycérol, 1µg/ml aprotinine, 1µg/ml leupeptine, 1µM pepstatine A, 0.1mM PMSF).

Les cellules traitées ont été lysées et les lysats cellulaires ont été dosés tel que décrit dans la section décrivant le dosage de l'activité Cdk2. Puis, 100µL de billes préparées (c'est-à-dire les billes ayant liées c-jun-gst) ont été ajoutés à 700µg de protéines contenues dans 1ml de tampon triton. Après 3h d'agitation à 4°C, les échantillons ont été centrifugés à 5000rpm, 5min à 4°C, lavés une fois dans du tampon triton puis deux fois dans du tampon kinase (20mM Hepes pH 7.4, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 10mM pNPP, 0.1mM PMSF, 1µg/ml aprotinine, 1µg/ml leupeptine, 1µM pepstatine A). Les culots ont ensuite été resuspendus dans 40µL de tampon kinase suppléé avec 50µM d'ATP et 2µCi AT <sup>32</sup>P et incubés à 30°C. La réaction a été arrêtée 30min plus tard avec du Laemmli. Après une séparation des protéines par SDS-PAGE 12.5%, la phosphorylation de c-jun a été évaluée par autoradiographie.



### 5.3. Dosage de l'activité p38 MAPK

Le dosage s'est effectué comme décrit dans la section du dosage de l'activité cdk2. Cependant, 8µL d'anticorps primaire ont été utilisés pour immunoprécipiter la p38 MAPK à partir de 700µg de protéines des lysats cellulaires contenus dans 1ml de tampon triton tandis que 0.25mg/ml MBP (myelin basic protein) a été employé comme substrat pour le dosage de l'activité.

### 6. Préparation des acini pancréatiques

Le pancréas d'un rat Sprague-Dawley sain préalablement mis à jeun pour la nuit a été extrait et dépouillé de son gras et des mésentères. La suspension d'acini pancréatiques a été préparée comme déjà rapporté par Peikin *et al.* (1978). Durant cette opération, le pancréas est maintenu dans un tampon standard (HEPES 24.1mM, NaCl 98mM, KCl 6mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.1mM, Pyruvate 5mM, Fumarate 5mM, glutamate 5mM, Dextrose 11.4mM, 0.01% SBTI (Soybean Trypsin Inhibitor), 2.5% d'un mélange d'acides aminés, 2% de glutamine, 1% de vitamines essentielles et du MgCl<sub>2</sub> 1.2mM) contenant 0.2% d'albumine et 2mM de CaCl<sub>2</sub>. Le pancréas a par la suite été injecté avec 5ml de tampon de digestion (tampon standard contenant 0.2% d'albumine, 2mM CaCl<sub>2</sub> et 30U/ml de collagénase). Le pancréas et le tampon de digestion ont été

transférés dans un erlenmeyer, ce dernier a été saturé d'oxygène, puis placé à 37°C sous agitation maximale. Après 10 min, la solution de digestion a été remplacée par 5ml d'une solution de digestion fraîche et l'erlenmeyer a de nouveau été saturé en oxygène puis replacé à 37°C sous agitation maximale. L'opération a été répétée après 10 autres min. Après ce second 10 min, la solution de digestion a été retirée, puis le pancréas a été lavé 3 fois avec 5ml de tampon standard contenant 0.2% d'albumine et 2mM CaCl<sub>2</sub>. Le pancréas a de nouveau été digéré avec 5ml de solution de digestion sous air saturé en oxygène, à 37°C et sous agitation maximale pour 10 min. Au terme de ces 10 min, le pancréas a été dissocié en procédant à une série de 10 va-et-vient dans une pipette sérologique de 10ml. Le tissu dissocié a été déposé dans deux tubes contenant 4 ml de tampon standard suppléé avec 4% d'albumine et 2mM CaCl<sub>2</sub>. Les gros morceaux de tissu non-dissocié ont été enlevés avant la centrifugation subséquente de 1 min à 1 000rpm. Les culots ont été resuspendus dans 2.5ml de tampon standard contenant 0.2% albumine et 2mM CaCl<sub>2</sub> et cette étape de séparation des types cellulaires par dépôt des cellules sur tampon standard contenant 4% albumine (et 2mM CaCl<sub>2</sub>) a été répétée deux autres fois. À la toute fin, le culot contenant presque exclusivement les acini pancréatiques d'un pancréas a été resuspendu dans 8ml de solution d'incubation (tampon standard suppléé avec 1% albumine et 0.5mM CaCl<sub>2</sub>) et les acini ont été laissés au repos pendant 30 min à la température ambiante avant d'entamer les études.

1ml d'acini préparés et saturés en oxygène ont été préincubés 30 min à 37°C sous agitation avec les substances à l'essai (forskoline + IBMX, sécrétine) avant d'être stimulés 10 min ou 2h avec la caeruleine, toujours à 37°C sous agitation. Après les temps indiqués, les acini traités ont été centrifugés 15 min à 12 000 rpm et lavés trois fois avec du PBS contenant 250µM d'orthovanadate avant d'être lysés dans du tampon triton (1% triton X-100, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 40mM β-glycérophosphate, 50mM NaF, 200µM orthovanadate, 10% glycérol, 1µg/ml aprotinine, 1µg/ml leupeptine, 1µM pepstatine A, 0.1mM PMSF). Les protéines ont été dosées par la méthode BCA (Pierce).

## 7. Transfections

### 7.1. Transfection transitoire et essai luciférase

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits puis, 24h plus tard, elles ont été transfectées par la méthode de lipofection (GIBCO BRL, MD). Brièvement, 1µg de lipofectine a été pré-incubée pendant 45min dans 20µL de milieu OPTI-MEM (Solution B). Pendant ce temps, l'ADN, à raison de 0.2µg/puit, a été ajouté à 20µL de milieu OPTI-MEM (Solution A). La solution A et la solution B ont par la suite été combinées et laissées à la

température ambiante. Après 10-15min, du milieu sans sérum est ajouté afin de compléter le volume à 200 $\mu$ L (Solution C). Après un rinçage des cellules au milieu sans sérum, celles-ci ont été incubées toute une nuit avec 200 $\mu$ L/puit de la solution C. Le lendemain matin, la solution a été retirée des puits et remplacée par du milieu DMEM contenant 10% de sérum en plus des substances à l'étude.

24h plus tard, les cellules ont été rincées deux fois au PBS et lysées 10-15min dans 300 $\mu$ L de tampon de lyse ajusté à pH 7.8 ( 25mM glycylglycine, 15mM MgSO<sub>4</sub> , 4mM EGTA, 1% Triton X-100, 2mM DTT). Par la suite, à 270 $\mu$ L de lysat prélevé ont été ajoutés 120 $\mu$ L de solution d'essai (25mM glycylglycine, 15mM MgSO<sub>4</sub> , 4mM EGTA, 15mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> , ajusté à pH 7.6, en plus de 6mM ATP, 3mM DTT) et 100 $\mu$ L de tampon luciférine (25mM glycylglycine, 15mM MgSO<sub>4</sub> , 4mM EGTA, 1mM D-luciférine). Finalement, l'activité luciférase a été mesurée pendant 20s à l'aide d'un luminomètre de type Mini Lumat LB9506 (EG&G Berthold, Germany).

## 7.2. Transfection stable

Les cellules ont étéensemencées dans une boîte de pétri 100mm et transfectées 24h plus tard par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. En résumé, une heure avant la transfection, le milieu de culture a été

remplacé par 6ml de milieu frais. Pour chacun des pétris, 7µg de l'ADN d'intérêt ainsi que 3µg du vecteur de sélection (pcDNA3) ont été utilisés, ceux-ci ayant été dilués dans 270µL d'eau stérile. À ce volume, 30µL de CaCl<sub>2</sub> 2.5M et 300µL de HBS (280mM NaCl, 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12mM glucose, 10mM KCl, 50mM HEPES pH 7.05) ont été ajoutés goutte à goutte. Les 600µL totaux (représentant 1/10 du volume de milieu contenu dans le pétri) ont été déposés dans le pétri et les cellules ont été laissées à 37°C (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) pendant toute la nuit. Elles ont ensuite été rincées deux fois avec du PBS, une fois avec du milieu de culture et incubées dans du milieu de culture jusqu'à ce qu'elles atteignent 90% de confluence. Elles ont alors été trypsinisées et réensemencées dans du milieu de culture contenant 500µg/ml de G418 pour permettre la sélection des clones.

### 7.3. Vecteur rapporteur et vecteurs d'expression

Le vecteur rapporteur E2F-luciférase contient une partie d'un promoteur reconnu spécifiquement par E2F soit celui de la dihydrofolate réductase couplé au gène de la luciférase. Un E2F actif peut donc se lier à ce promoteur et permettre une transcription de la luciférase (Slansky *et al.*, 1993).

Les ADNc de la MEK sauvage (MEK WT) de hamster ainsi que son homologue constitutivement actif (MEK CA) ont été étiquetés en leur

extrémité N-terminale par neuf résidus de l'hémagglutinine du virus de l'influenza (HA1) pour faciliter leur détection et clonés dans le vecteur d'expression pECE (Pagès *et al.*, 1994). La MEK CA tire son activité constitutive par le fait que des acides aspartiques remplacent les sérines 218 et 222 habituellement phosphorylées par Raf et ainsi, ces acides aspartiques miment la charge négative normalement amenée par la phosphorylation de Raf-1 (Pagès *et al.*, 1994). Le vecteur pcDNA3 a été utilisé afin de sélectionner les transfectants puisqu'il contient un gène de résistance à l'antibiotique généticine (G418).

## 8. Mesure de l'apoptose

### 8.1. Fragmentation de l'ADN

500 000 cellules ont étéensemencées par boîte de pétri 100mm 48h avant la mise à jeun et l'ajout des substances à l'étude. Suite au traitement, les cellules ont été lysées dans 700µL de tampon de lyse (0.6% SDS, 10mM EDTA) pendant 20 min à la température ambiante. Les lysats cellulaires ont été transférés dans un eppendorf et du NaCl a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 1M. Après avoir été placés à 4°C pendant toute une nuit, les lysats cellulaires ont été centrifugés à 13 000rpm pendant 30 min à 4°C. Les surnageants ont été soumis à une extraction avec un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamyl (25 :24 :1) puis centrifugés 10 min à

13000rpm. Après récupération de la phase aqueuse, du NaCl a été ajouté pour élever la concentration finale à 1.3M puis l'ADN a été précipité avec un volume d'isopropanol froid (-20°C). L'ADN a été culoté grâce à une centrifugation de 30 min à 13 000rpm à 4°C, lavé avec de l'EtOH 70% froid (-20°C) puis reculoté par centrifugation durant 10 min à 13 000rpm avant d'être resuspendu dans du TE (10mM Tris pH8, 10mM EDTA). Pour éliminer tout ARN contaminant, les échantillons ont été traités avec 80µg/ml d'ARNase (dépourvue d'ADNases) pendant 2h à 37°C. Une quantité égale d'ADN a été mise sur gel d'agarose 1.5% et la fragmentation de l'ADN a pu être visualisée par coloration au bromure d'éthidium (50µg de bromure d'éthidium dans 100ml de gel d'agarose).

## 8.2. Dosage de l'activité des familles de la CASP-1 et CASP-3

Le dosage a été effectué comme précédemment décrit par Nicholson *et al.* (1995). Brièvement, pour chacune des réactions, 20µM de substrat, Ac-YVAD-AMC pour le dosage des caspases de la famille CASP-1 et Ac-DEVD-AMC pour le dosage des caspases de la famille CASP-3, et 25µg de protéines de l'échantillon ont été incubés dans le tampon d'essai (20mM HEPES pH7.5, 10% glycérol, 2mM DTT) pendant 2h à 37°C. L'émission émise par le peptide fluorogénique AMC libéré suite à l'activité caspase a été mesurée grâce à un

**spectrofluoromètre où la longueur d'onde d'excitation était de 380nm et celle d'émission de 460nm.**

## **9. Présentation des résultats**

**Toutes les expériences ont été effectuées au moins en triplicata. Les résultats représentent la moyenne accompagnée de l'erreur standard (SE).**



## **CHAPITRE III**

### **RÉSULTATS**

#### **1. Effet de l'AMPc et du TGF $\beta$ sur la prolifération des cellules pancréatiques tumorales humaines**

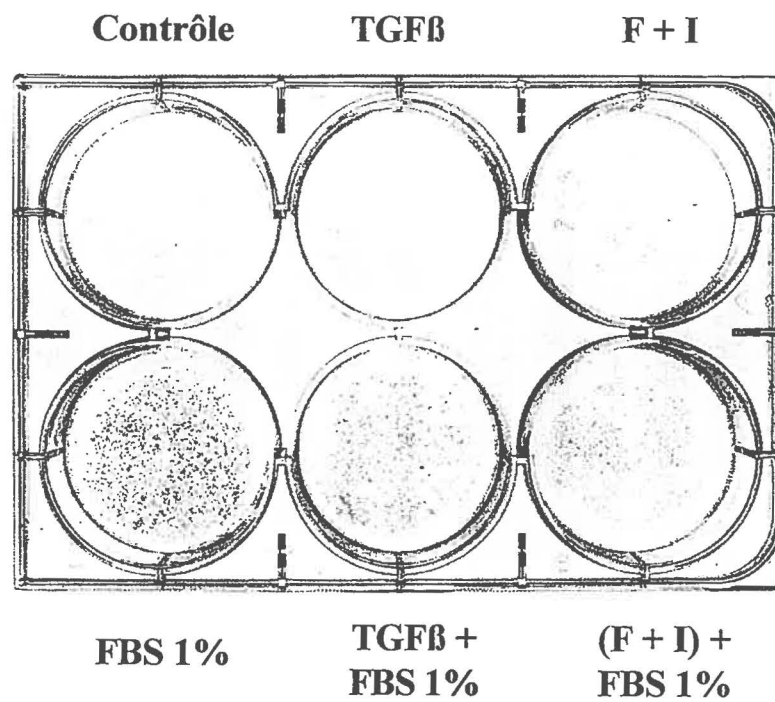
Le premier objectif du présent travail était d'évaluer l'effet de l'AMPc et du TGF $\beta$  sur la prolifération de cellules pancréatiques tumorales humaines : les PANC-1 et les MIA PaCa-2. Le niveau intracellulaire d'AMPc a été augmenté en favorisant la formation de ce dernier à l'aide de la forskoline, un activateur de l'adénylyl cyclase (Seamons et Daly, 1986), et en inhibant sa dégradation grâce à l'IBMX (isobutyl-méthyl-xanthine) agissant comme un inhibiteur de phosphodiesterases (Parson *et al.* 1988).

Nous avons d'abord évalué l'effet de l'AMPc et du TGF $\beta$  sur la prolifération à long terme des cellules PANC-1 et MIA PaCa-2 par la méthode de croissance clonale. Les cellules ont étéensemencées à très faible confluence et privées en sérum le lendemain de l'ensemencement. À ce moment, 4 $\mu$ g/ml de forskoline + 1mM IBMX (Pelletier *et al.*, 1998) ou 5ng/ml de TGF $\beta$  (Yu *et al.*, 1999) en présence ou non de 1% sérum ont été ajoutés aux puits. À noter

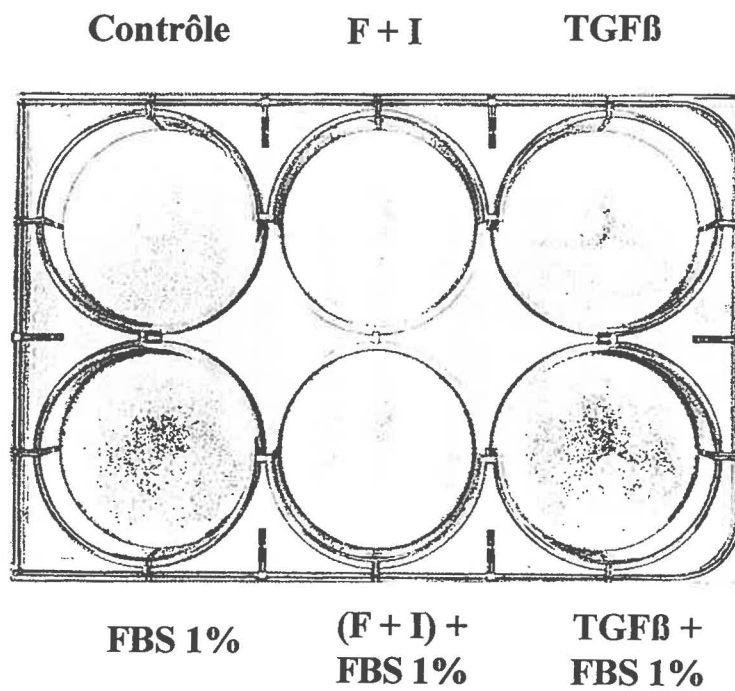
**Figure 8. Effet du TGF $\beta$  et de la forskoline + IBMX (F + I) sur la prolifération des cellules pancréatiques tumorales humaines**

Les cellules ont étéensemencées à très faible confluence, privées de sérum 24h plus tard en présence de 4 $\mu$ g/mL de forskoline + 1mM IBMX, 5ng/mL de TGF $\beta$  ( tous ajoutés aux 24h) ou 1% FBS. Au terme de 5 jours, les colonies formées ont été colorées à l'aide du bleu de Giemsa. **A.** cellules PANC-1 **B.** cellules MIA PaCa-2

**A.**



**B.**



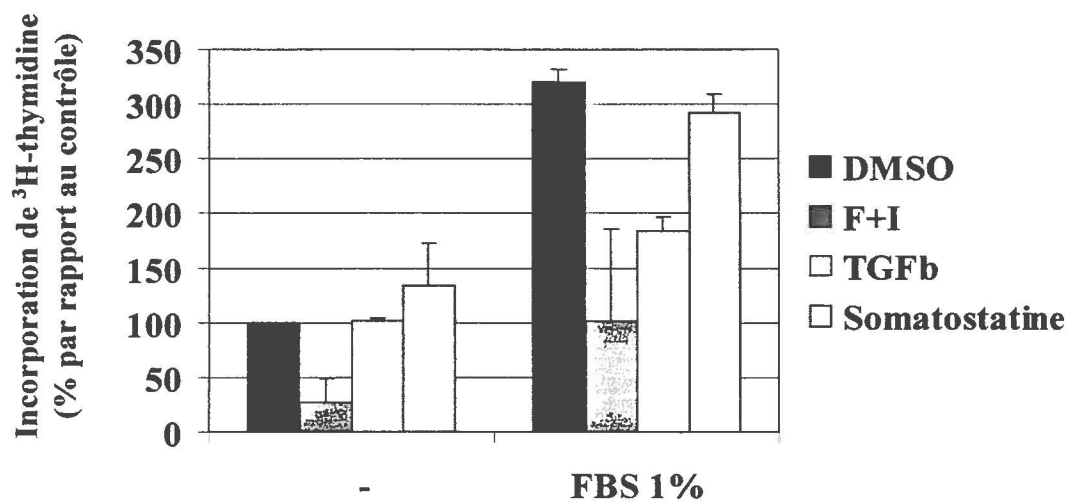
que les agents anti-mitogéniques forskoline + IBMX et TGF $\beta$  ont été additionnés à toutes les 24h. Les cellules ont ainsi crû pendant cinq jours et les colonies formées ont été colorées au bleu de Giemsa qui met en évidence les clones. La figure 8 présente les résultats obtenus lors de cette expérience. On observe que la forskoline + IBMX inhibent considérablement la prolifération cellulaire des cellules PANC-1 (fig. 8A) et MIA PaCa-2 (fig. 8B) stimulée par le sérum tandis que le TGF $\beta$  n'affecte que partiellement la prolifération d'une seule lignée cellulaire, les PANC-1 (fig. 8A).

La réinitiation de synthèse d'ADN est un autre moyen d'évaluer la prolifération cellulaire mais elle consiste en une estimation à plus court terme. Ainsi, l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine dans l'ADN des cellules préalablement mises à jeun puis stimulées pendant 22h avec 4 $\mu\text{g/ml}$  de forskoline + 1mM IBMX, 5ng/ml de TGF $\beta$ , 10 $^{-6}\text{M}$  somatostatine en présence ou non de 1% sérum a été mesurée. À ce moment, nous avons aussi examiné l'effet de la somatostatine puisqu'elle avait été préalablement décrite comme un agent anti-mitogénique potentiel des cellules pancréatiques tumorales humaines (Liebow *et al.*, 1989; Radulovic *et al.*, 1993; Takeda et Escribano, 1991). La figure 9 nous indique que 1- les deux lignées cellulaires, en absence de facteurs de croissance exogènes, incorporent la  $^3\text{H}$ -thymidine suggérant qu'elles sont aptes à proliférer dans un milieu dépourvu de sérum

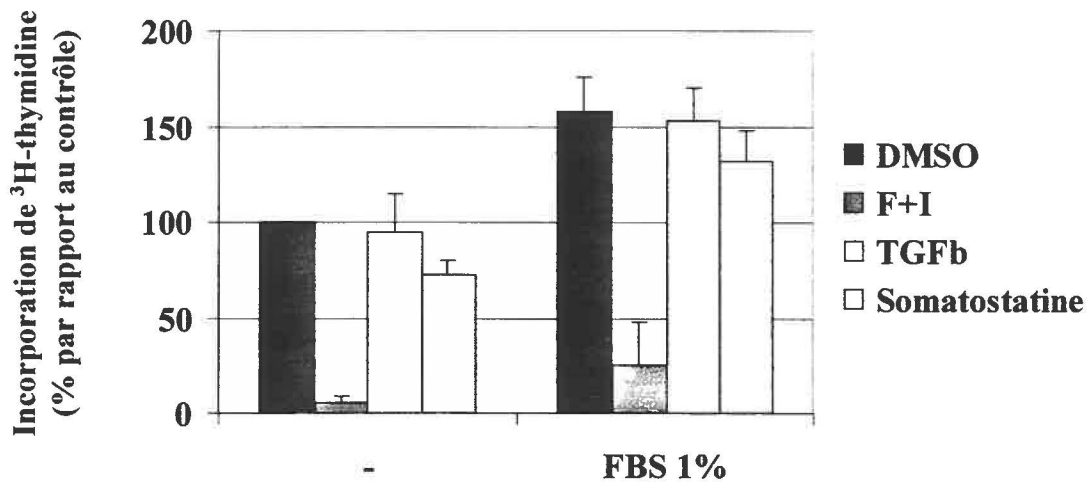
**Figure 9. Effet du TGF $\beta$  et de la forskoline + IBMX (F + I) sur la réinitiation de la synthèse d 'ADN des cellules pancréatiques tumorales humaines**

Les cellules ont étéensemencées privées de sérum 24h plus tard pour une période de 24h. Elles ont ensuite été stimulées pendant 22h avec 4 $\mu$ g/mL de forskoline + 1mM IBMX, 5ng/mL de TGF $\beta$ , 10<sup>-6</sup> M de somatostatine ou 1% FBS. Durant les deux dernières heures, 1 $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-thymidine a été ajouté. Les cellules ont ensuite été rincées avec du TCA 5%, rincées à l 'H<sub>2</sub>O et solubilisées dans du NaOH 0.1N. La radioactivité incorporée a par la suite été déterminée. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle non-traité (DMSO). **A. cellules PANC-1 B. cellules MIA PaCa-2**

A.



B.



(Freeman *et al.*, 1995); 2- le traitement des cellules au sérum 1% favorise l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine de 3.2 fois dans les cellules PANC-1 et de 1.6 fois dans les cellules MIA PaCa-2; 3- la forskoline + IBMX inhibent l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine dans les cellules en absence ou en présence de sérum 1% de 73% et 68% respectivement dans les PANC-1 et de 94% et 84% dans les MIA PaCa-2; 4- le TGF $\beta$ , en accord avec les résultats obtenus en croissance clonale, bloque de 43% l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine seulement dans les cellules PANC-1 stimulées au sérum 1%; 5- finalement, la somatostatine, à une concentration de  $10^{-6}\text{M}$ , n'a aucun impact sur l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine dans les cellules privées ou non de sérum 1% autant chez les PANC-1 que chez les MIA PaCa-2. Étant donné cette absence d'effet de la somatostatine sur la prolifération cellulaire chez les deux lignées cellulaires étudiées, nous n'avons pas poursuivi les études avec cette hormone.

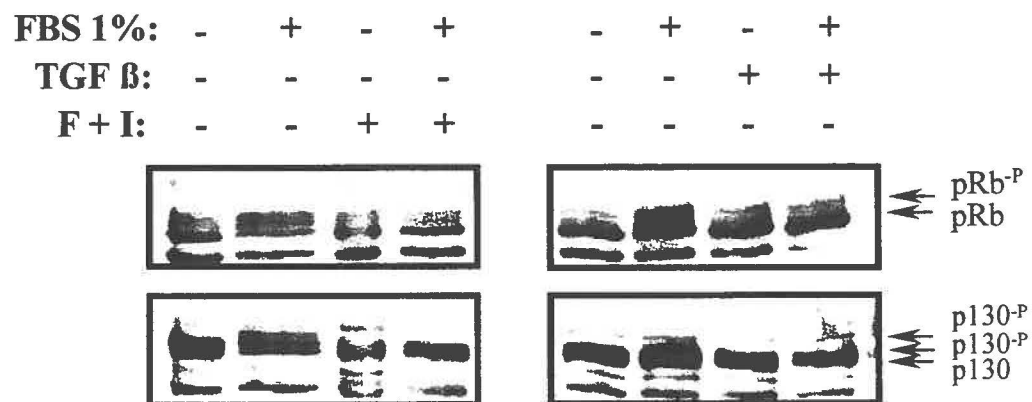
Pour s'assurer que les cellules étaient bien bloquées en phase G1 du cycle cellulaire, nous avons regardé les niveaux de phosphorylation des protéines de la famille de pRb. Comme il a été expliqué dans l'introduction, les protéines pRb phosphorylées permettent la libération de facteurs de transcription E2F qui sont importants dans la transcription de gènes utiles à l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Nevins, 1992; Grana *et al.*, 1998). Tout d'abord, on peut remarquer que les cellules privées en sérum depuis 48h possèdent des niveaux significatifs des formes hyperphosphorylées de pRb et

**Figure 10. Effet du TGF $\beta$  et de la forskoline + IBMX (F + I) sur les niveaux de phosphorylation des protéines de la famille de pRb chez les cellules pancréatiques tumorales humaines**

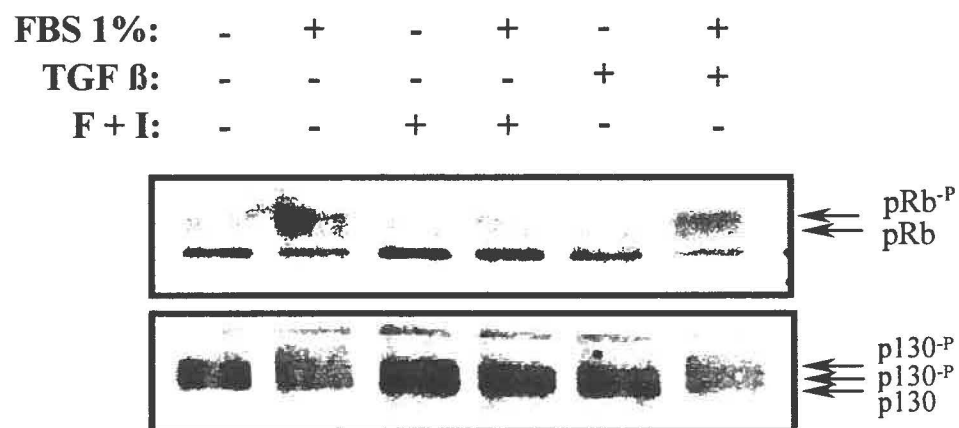
60 $\mu$ g de protéines des lysats issus des cellules traitées pendant 16h (4 $\mu$ g/mL forskoline + 1mM IBMX, 5ng/mL de TGF $\beta$ , ou 1% FBS) ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE 7.5% et analysés par immunobuvardage (pRb = 1/750 et p130 = 1/1000) **A. cellules PANC-1**  
**B. cellules MIA PaCa-2**



A.



B.



**p130. Ceci est en accord avec le résultat précédent démontrant que ces cellules sont capables de progresser dans le cycle cellulaire (incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine) en absence totale de facteurs de croissance exogènes. L'addition de sérum 1% aux deux lignées cellulaires provoque une augmentation des formes hyperphosphorylées de pRb et p130 (fig. 10). Le traitement des deux lignées cellulaires avec la forskoline + IBMX inhibe complètement l'effet du sérum sur l'hyperphosphorylation de pRb et p130 (Fig. 10). Cependant, le traitement avec le TGF $\beta$  bloque l'effet du sérum sur l'hyperphosphorylation de pRb et p130 seulement dans les PANC-1 (fig. 10).**

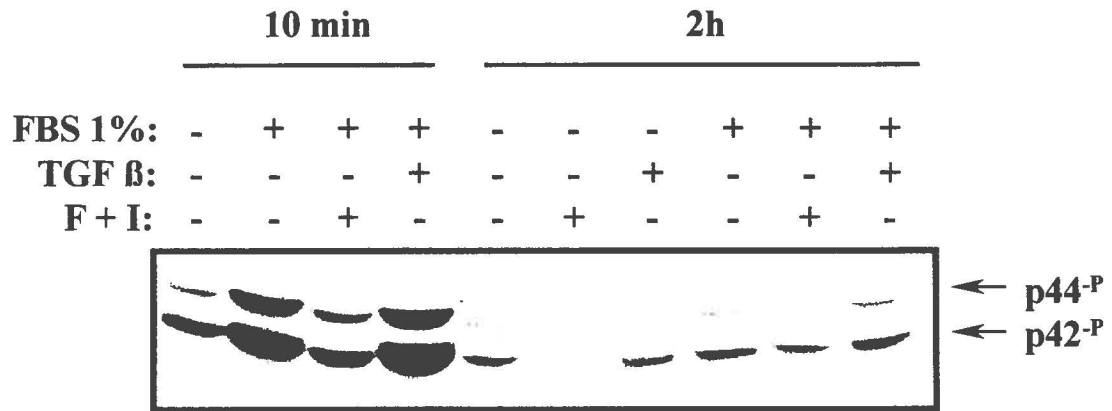
## **2. Effet de l'AMPc et du TGF $\beta$ sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les cellules pancréatiques tumorales humaines**

Après s'être assuré que l'AMPc et le TGF $\beta$  freinaient la prolifération des cellules pancréatiques tumorales humaines, nous avons poussé nos études afin de savoir comment ces deux agents agissaient. Tout d'abord, l'activité des p42/p44 MAPKs a été analysée. En accord avec les études déjà publiées (Kahan *et al.*, 1992; Meloche *et al.*, 1992), le traitement des cellules au sérum 1% a stimulé l'activité de ces kinases dans les PANC-1 (fig. 11A) et MIA PaCa-2 (fig. 11B) d'une façon rapide (10min) et soutenue (2h). Une pré-incubation préalable de 30min des cellules à la forskoline (4 $\mu\text{g/ml}$ ) + IBMX

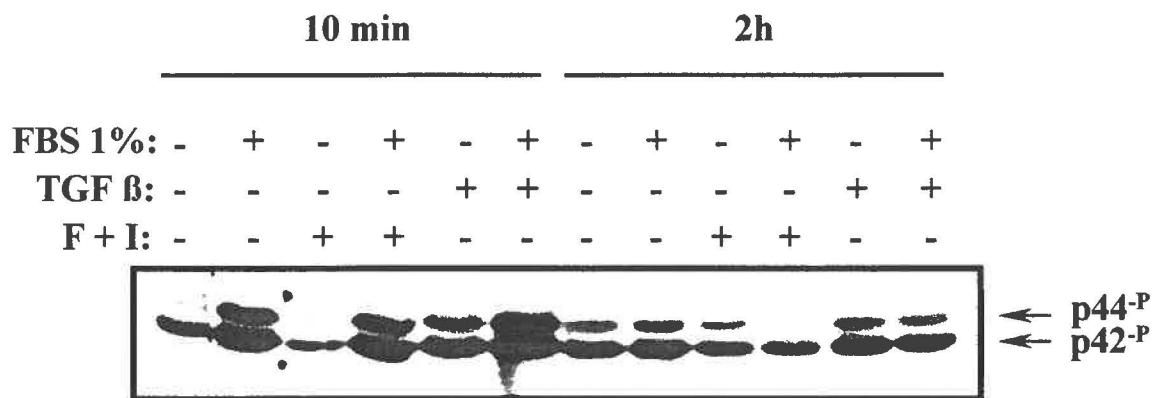
**Figure 11. Effet du TGF $\beta$  et de la forskoline + IBMX (F + I) sur  
l'activité des p42/p44 MAPKs dans les cellules pancréatiques  
tumoraes humaines**

60 $\mu$ g de protéines des lysats issus des cellules pré-traitées 30 min avec 4 $\mu$ g/mL de forskoline + 1mM IBMX ou 5ng/mL de TGF $\beta$  puis stimulées avec 1% FBS pendant 10min ou 2h ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE 10% et analysés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement la forme phosphorylée (active) des p42/p44 MAPKs (anticorps utilisé 1/500). A. cellules PANC-1 B. cellules MIA PaCa-2

**A.**



**B.**



(1mM) a inhibé cette activation des p42/p44 MAPKs provoquée par le sérum 1% et a même réduit l'activité de celles-ci dans les deux lignées cellulaires privées de sérum (fig. 11). Quant au TGF $\beta$  (5ng/ml), il n'a eu aucun effet sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les deux lignées cellulaires.

### 3. Effet de l'AMPc et du TGF $\beta$ sur l'expression des protéines du cycle cellulaire

Un deuxième niveau de régulation de la prolifération cellulaire existe au cœur du cycle cellulaire, plus précisément dans la phase G1. La prochaine étape a donc été d'examiner l'expression des différentes protéines qui régularisent la phase G1 du cycle cellulaire.

La figure 12 nous révèle qu'après 16h de traitement avec la forskoline (4 $\mu$ g/ml) + IBMX (1mM)  $\pm$  sérum 1% ou TGF $\beta$  (5ng/ml)  $\pm$  sérum 1%, l'expression des cyclines D1 et E ne semble pas être modulée de façon significative dans les PANC-1 (fig. 12A). Dans les MIA PaCa-2 (fig. 12B), d'une façon surprenante, l'expression de la cycline D1 semble diminuée dans les cellules ayant été stimulées avec le sérum 1%. Néanmoins, l'expression de cette cycline dans les cellules stimulées au sérum 1% et traitées avec la forskoline + IBMX ou le TGF $\beta$  n'est pas significativement modulée rendant

**Figure 12. Effet du TGF $\beta$  et de la forskoline + IBMX (F + I) sur  
l'expression des cyclines de la phase G1 du cycle cellulaire dans les  
cellules pancréatiques tumorales humaines**

60 $\mu$ g de protéines des lysats issus des cellules traitées pendant 16h  
(4 $\mu$ g/mL forskoline + 1mM IBMX, 5ng/mL de TGF $\beta$ , ou 1% FBS) ont  
été soumis à une séparation par SDS-PAGE 10% et analysés par  
immunobuvardage (cycline D1 et E utilisés 1/1000) **A. cellules PANC-1**  
**B. cellules MIA PaCa-2**

**A.**

<b>FBS 1%:</b>	-	-	-	+	+	+
<b>TGF <math>\beta</math>:</b>	-	-	+	-	-	+
<b>F + I:</b>	-	+	-	-	+	-



← Cycline D1



← Cycline E

**B.**

<b>FBS 1%:</b>	-	-	-	+	+	+
<b>TGF <math>\beta</math>:</b>	-	-	+	-	-	+
<b>F + I:</b>	-	+	-	-	+	-



← Cycline D1

<b>FBS 1%:</b>	-	+	-	+	-	+
<b>TGF <math>\beta</math>:</b>	-	-	-	-	+	+
<b>F + I:</b>	-	-	+	+	-	-



← Cycline E

peu probable un rôle de l'inhibition d'expression de cette cycline dans l'inhibition de prolifération induite par la forskoline + IBMX.

Par la suite, nous avons procédé à l'évaluation de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire. Tout d'abord, comme décrit dans la littérature (Firpo *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1994; Nourse *et al.*, 1994; Slingerland *et al.*, 1994), l'expression de p27<sup>Kip1</sup> a diminué suite à une stimulation mitogénique. Plus précisément, dans les cellules stimulées pendant 16h avec 1% sérum, son expression chute de 56% dans les PANC-1 (fig. 13A) et de 52% dans les MIA PaCa-2 (fig. 13B). Le traitement des cellules à la forskoline (4µg/ml) + IBMX (1mM) a eu pour effet d'augmenter l'expression de p27<sup>Kip1</sup> 1- dans les cellules non-stimulées (de 25% dans les PANC-1 et de 43% dans les MIA PaCa-2) ainsi que 2- dans les cellules stimulées au sérum 1% (l'expression est 1.6 fois plus élevée par rapport à l'expression de l'inhibiteur dans les cellules stimulées au sérum 1% dans les PANC-1 et de 3.5 fois dans les cellules MIA PaCa-2). Le TGFβ n'a pas affecté l'expression de cet inhibiteur dans ni l'une ni l'autre des lignées cellulaires.

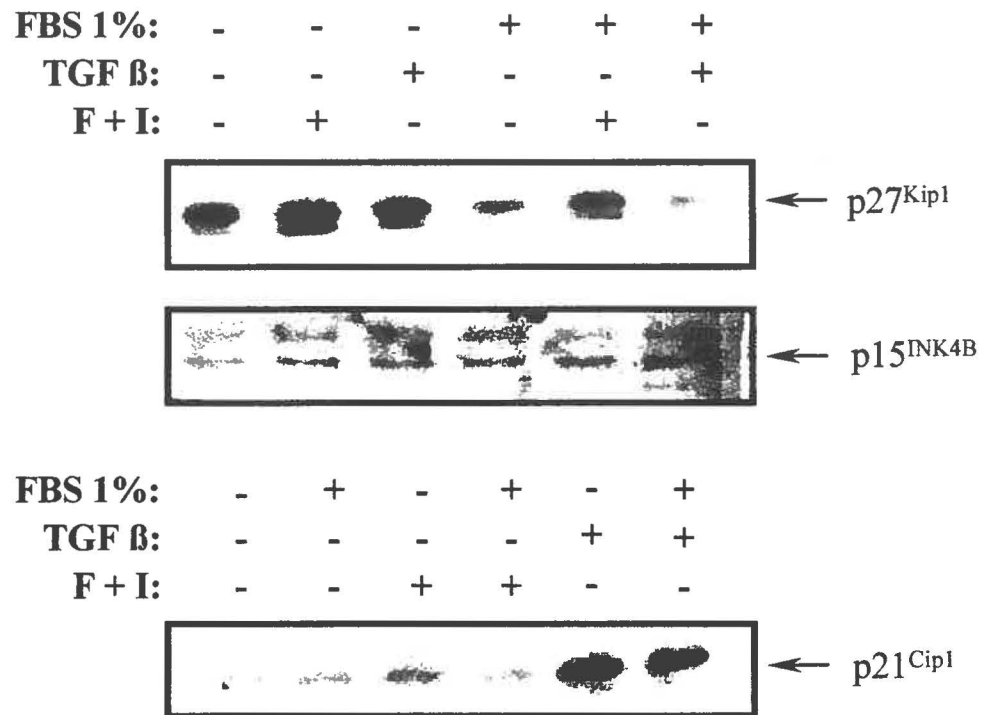
L'inhibiteur p21<sup>Cip1</sup> n'a subi aucune variation de son expression dans les cellules MIA PaCa-2, mais a augmenté de 265% et de 223% par rapport aux cellules non stimulées dans les cellules PANC-1 traitées avec le TGFβ (5ng/ml)



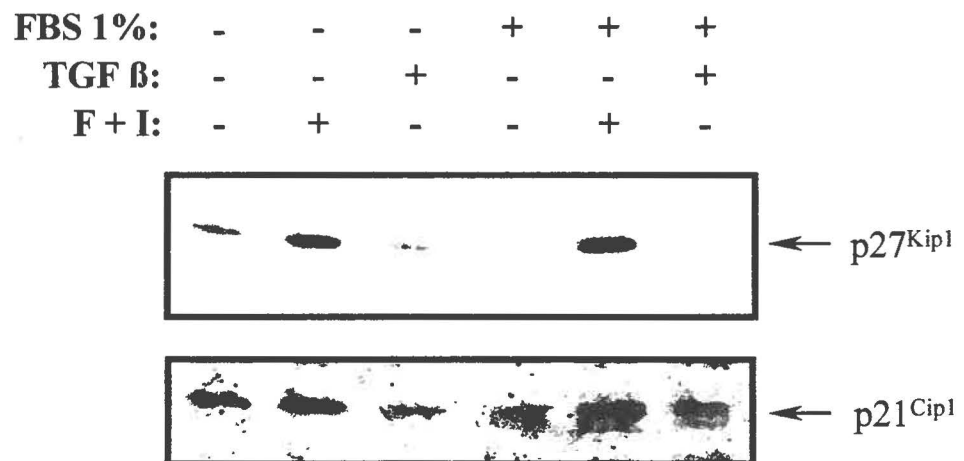
**Figure 13. Effet du TGF $\beta$  et de la forskoline + IBMX (F + I) sur l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire dans les cellules pancréatiques tumorales humaines**

60 $\mu$ g de protéines des lysats issus des cellules traitées pendant 16h (4 $\mu$ g/mL forskoline + 1mM IBMX, 5ng/mL de TGF $\beta$ , ou 1% FBS) ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE 12.5% et analysés par immunobuvardage (p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>Cip1</sup> et p15<sup>INK4B</sup> utilisés 1/1000) A. cellules PANC-1 B. cellules MIA PaCa-2

**A.**



**B.**



seul ou en combinaison avec le sérum 1% (fig. 13A). Comparé aux cellules non traitées, le TGF $\beta$  a également eu pour effet d'augmenter l'expression de l'inhibiteur p15<sup>INK4B</sup> de 128% dans les cellules PANC-1 stimulées avec 1% sérum. Malheureusement, nous n'avons jamais été capable de détecter la présence de cet inhibiteur dans les cellules MIA PaCa-2. Une explication plausible repose sur la possibilité que ce dernier comporte une délétion homozygote entraînant sa perte d'expression, phénomène qui a déjà été observé dans les cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2 (Villuaneva *et al.*, 1998).

Pour vérifier si le TGF $\beta$ , dans les cellules PANC-1, avait une autre cible que p21<sup>Cip1</sup> et p15<sup>INK4B</sup>, nous avons examiné l'expression de cdc25A, une phosphatase responsable de l'activation des complexes cycline D-cdk4/6 et cycline E-cdk2 et ayant déjà été identifiée comme cible du TGF $\beta$  dans les cellules épithéliales mammaires humaines MCF10A (Iavarone et Masagué, 1997). Comme le démontre la figure 14, la cytokine, de même que la forskoline + IBMX, demeurent sans effet sur l'expression de cette phosphatase.

**Figure 14. Effet du TGF $\beta$  et de la forskoline + IBMX (F + I) sur l'expression de la phosphatase Cdc25A dans les cellules PANC-1**

60 $\mu$ g de protéines des lysats issus des cellules traitées pendant 16h (4 $\mu$ g/mL forskoline + 1mM IBMX, 5ng/mL de TGF $\beta$ , ou 1% FBS) ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE 10% et analysés par immunobuvardage (anticorps 1/1000)

<b>FBS 1%:</b>	-	-	-	+	+	+
<b>TGF <math>\beta</math>:</b>	-	-	+	-	-	+
<b>F + I:</b>	-	+	-	-	+	-



#### **4. Effet de l'AMPc et du TGF $\beta$ sur l'activité cdk2 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines**

Étant donné le rôle des inhibiteurs du cycle cellulaire dans l'inhibition de l'activité des complexes cycline D-cdk4/cdk6 et cycline E-cdk2, la prochaine étape était de doser l'activité cdk2 dans nos cellules traitées afin de confirmer nos résultats obtenus jusqu'à présent.

Dans les cellules PANC-1, les cellules mises en présence de sérum pour une période de 16h démontrent une activité cdk2 plus élevée (de près de 2 fois) que les cellules non-stimulées comme le témoigne la figure 15 (A et B).

Lorsque les cellules sont traitées à la forskoline + IBMX, l'activité cdk2 en absence de sérum est diminuée de 72% et celle induite par le sérum est réduite de 65% (fig. 15A). Une légère diminution de 16% de l'activité cdk2 est observée lorsque les cellules PANC-1 sont stimulées pendant 16h avec le TGF $\beta$  + sérum (fig. 15B).

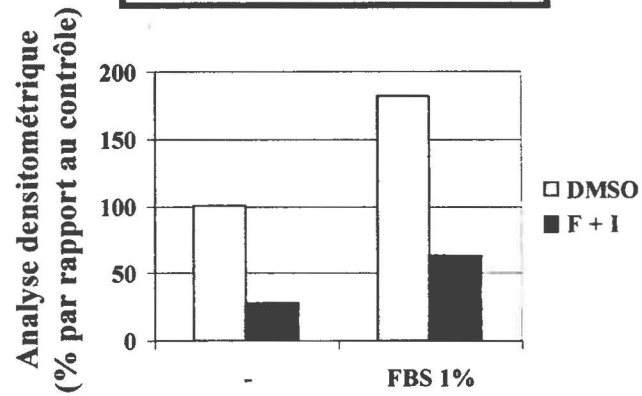
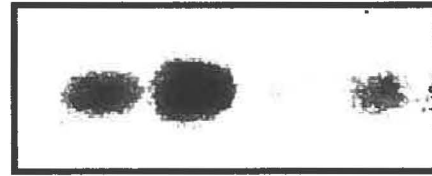
Dans les cellules MIA PaCa-2, le sérum provoque également une augmentation de l'activité cdk2 (de 105%) qui est inhibée de 58% dans les cellules traitées à la forskoline + IBMX (fig. 16A). Contrairement à ce qui avait été observé dans les cellules PANC-1, l'activité cdk2 en absence de sérum ne semble pas affectée par un tel traitement.

**Figure 15. Effet du TGF $\beta$  et de la forskoline + IBMX (F + I) sur  
l'activité cdk2 dans les cellules PANC-1**

La protéine cdk2 (3/1000) a été immunoprécipitée à partir de 700 $\mu$ g de protéines des lysats issus des cellules traitées pendant 16h (4 $\mu$ g/mL forskoline + 1mM IBMX, 5ng/mL de TGF $\beta$ , ou 1% FBS) et son activité a été dosée par la phosphorylation de l'histone H1 agissant comme substrat de cdk2. L'histone H1-P<sup>32</sup> a été visualisée suite à sa séparation sur SDS-PAGE 12.5% et à son autoradiographie A. Les cellules ont été traitées ou non avec 4 $\mu$ g/mL de forskoline + 1mM IBMX  $\pm$  1% FBS. En histogramme, on note la représentation graphique des résultats obtenus. B. L'activité cdk2 dans les cellules traitées avec 5ng/mL de TGF $\beta$   $\pm$  1% FBS et la représentation graphique.

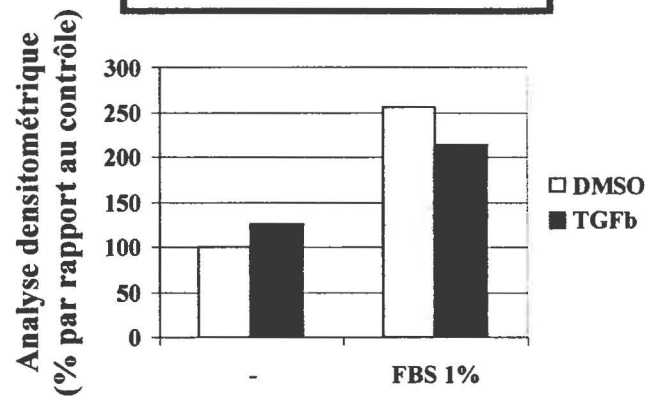
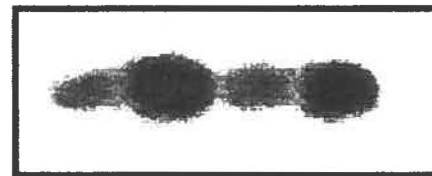
A.

<b>FBS 1%:</b>	-	+	-	+
<b>F + I:</b>	-	-	+	+



B.

<b>FBS 1%:</b>	-	+	-	+
<b>TGF <math>\beta</math>:</b>	-	-	+	+





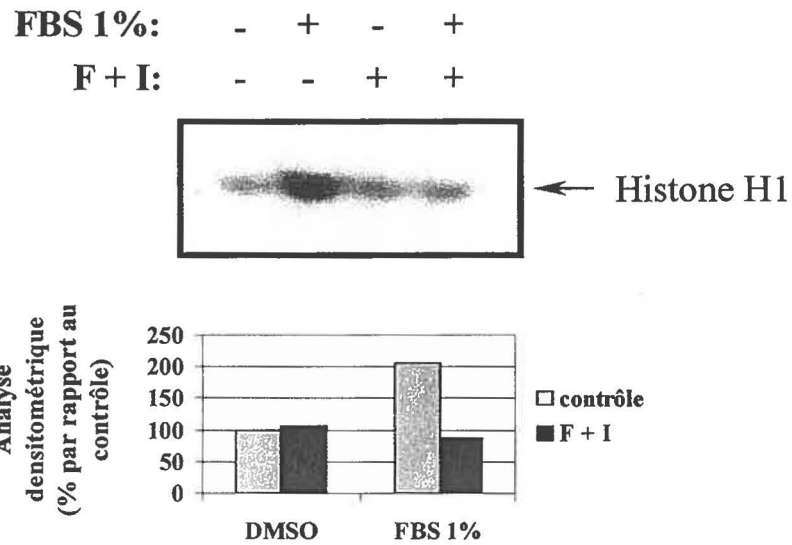
## **5. Rôle de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> dans l'inhibition de l'activité cdk2 causée par la forskoline + IBMX dans les cellules MIA PaCa-2**

Afin de prouver que l'augmentation d'expression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> avait une part de responsabilité dans l'inhibition de l'activité cdk2 causée par la forskoline + IBMX, nous avons immunoprécipité la protéine cdk2 que nous avons par la suite fait migrer sur SDS-PAGE. Nous avons par la suite procédé à un immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre p27<sup>Kip1</sup> dans le but de confirmer la liaison de cet inhibiteur à cdk2. Nous avons également effectué un immunobuvardage avec un anticorps spécifique à cdk2 afin de s'assurer qu'une même quantité de protéines avait été immunoprécipitée (fig. 16B). On constate que p27<sup>Kip1</sup> est réduit de 25% de l'immunoprécipité cdk2 dans les cellules MIA PaCa-2 stimulées par le sérum 1% pendant 16h (fig.16B et 16C), tandis que l'inhibiteur demeure lié à cdk2 lorsque les cellules sont traitées à la forskoline + IBMX : on note près de 2 fois plus de p27<sup>Kip1</sup> associé à cdk2 dans les cellules en absence de sérum traitées à la forskoline + IBMX et 2.5 fois dans celles stimulées à la fois avec la forskoline + IBMX et le sérum 1%. Dans les lysats protéiques totaux dans lesquels cdk2 n'a pas été immunoprécipité, on remarque que le niveau de p27<sup>Kip1</sup> par rapport à la quantité de cdk2 ne varie pas dans les cellules privées de sérum lorsque l'on ajoute la forskoline + IBMX cependant, dans les cellules stimulées au sérum 1%, dans lesquelles l'expression de p27<sup>Kip1</sup> diminue de 68% par rapport aux cellules non stimulées,

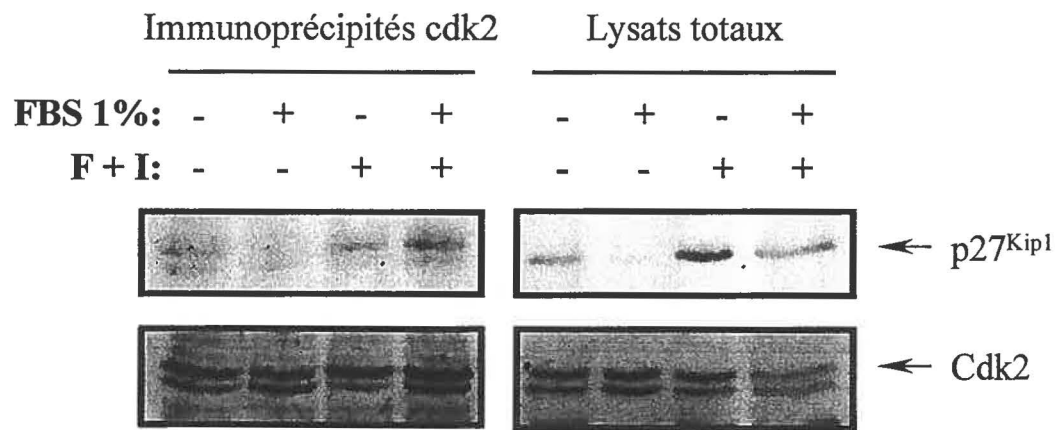
**Figure 16. Rôle de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> dans l'inhibition de  
l'activité cdk2 causée par la forskoline + IBMX (F + I) chez les  
cellules MIA PaCa-2**

La protéine cdk2 (3/1000) a été immunoprécipitée à partir de 700µg de protéines des lysats issus des cellules traitées pendant 16h (4µg/mL forskoline + 1mM IBMX ± 1% FBS) et le 1/3 de l'immunoprécipité a été utilisé pour doser l'activité cdk2 par la phosphorylation de l'histone H1 (A.). Les résultats sont également représentés sous forme d'histogramme. B. Les protéines du 2/3 de l'immunoprécipité restant ainsi que 40µg des lysats des cellules traitées non-immunoprécipitées avec l'anticorps anti-cdk2 (lysats totaux) ont été séparés sur SDS-PAGE 12.5% puis soumis à des immunobuvardages avec l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> (1/1000) et cdk2 (1/1000) utilisé comme contrôle interne. C. Représentation sous forme d'histogramme de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> associé à cdk2 (expression de p27<sup>Kip1</sup> en B/ expression cdk2 en B).

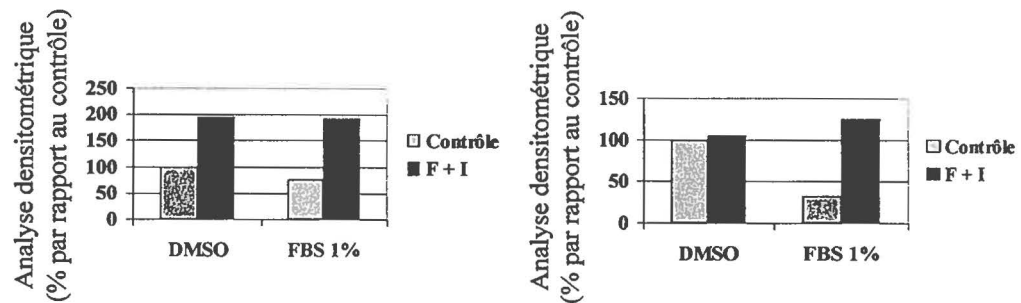
A.



B.



C.



le traitement à la forskoline + IBMX permet de maintenir un niveau d'expression de l'inhibiteur élevé (0.26 fois plus de p27<sup>Kip1</sup> dans les cellules traitées à la forskoline + IBMX + sérum 1% par rapport au contrôle non-stimulé et 4 fois plus par rapport au contrôle stimulé avec le sérum 1% seulement) (fig. 16C).

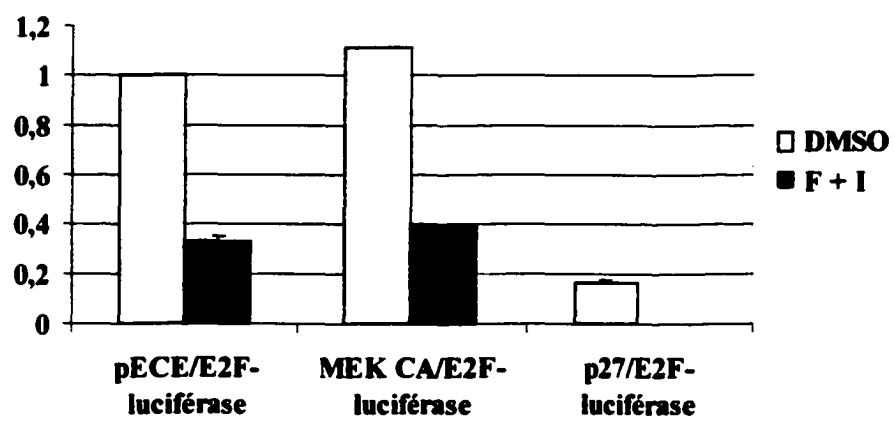
#### **6. Rôle des p42/p44 MAPKs et de p27<sup>Kip1</sup> dans l'inhibition de la prolifération des cellules PANC-1 causée par la forskoline + IBMX**

Jusqu'à présent, nous avons identifié deux cibles importantes de la forskoline + IBMX : les p42/p44 MAPKs et l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup>. Pour vérifier l'importance de chacun d'eux sur l'inhibition de prolifération cellulaire induite par ces agents anti-mitogéniques, nous avons d'abord co-transfecté de façon transitoire le vecteur pECE vide ou comprenant l'ADNc codant pour un mutant constitutivement actif de MEK1 (MEK CA) ainsi que le vecteur rapporteur E2F-luciférase. Le vecteur rapporteur E2F-luciférase contient une partie du promoteur de la dihydrofolate réductase qui est reconnu spécifiquement par les E2F ayant été libérés des protéines de la famille de pRb lors de la progression de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. Au lendemain de la transfection, nous avons mis les cellules en présence de forskoline (4µg/ml) + IBMX (1mM) + sérum 10% pendant 24h et procédé à un essai luciférase au terme de ces 24h. Il est à noter ici que l'effet de la forskoline + IBMX a été

**Figure 17. Rôle des p42/p44 MAPKs et de p27<sup>Kip1</sup> dans l'inhibition de la prolifération causée par la forskoline + IBMX (F + I)**

Les cellules PANC-1 ont été co-transfectées avec le vecteur rapporteur E2F-luciférase et le vecteur pECE vide, contenant le MEK CA ou encore p27<sup>Kip1</sup>. 24h après la transfection, les cellules en phase exponentielle de croissance ont été traitées avec 4µg/mL forskoline + 1mM IBMX (F + I) et 24h plus tard, l'activité luciférase a été mesurée.

**Activité luciférase**  
(Induction par rapport au contrôle)



évalué sur des cellules en phase exponentielle de croissance où le niveau d'inhibition de la prolifération par ces agents est sensiblement le même que dans les cellules stimulées avec 1% sérum. Nous avons utilisé des cellules en phase exponentielle de croissance afin de mieux voir l'activité du gène-rapporteur E2f-luciférase. La figure 17 nous révèle que le traitement des cellules contrôles (cellules transfectées avec le vecteur vide pECE) avec la forskoline + IBMX provoque une diminution considérable de 66% de l'activité du gène rapporteur E2F-luciférase. De plus, l'expression d'un mutant hyperactif de MEK1 n'est pas suffisante pour empêcher l'inhibition de l'activité E2F-luciférase causée par un traitement à la forskoline + IBMX. L'expression de ce mutant provoque une stimulation constitutive des p42/p44 MAPKs dans les fibroblastes (Brunet *et al.*, 1994). Cependant, une simple surexpression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> est suffisante pour inhiber par près de 85% l'activité E2F-luciférase normalement observée dans les cellules cultivées en présence de sérum 10% (fig. 17).

#### 7. Effet des agents connus pour augmenter les concentrations intracellulaires d'AMPC sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les acini pancréatiques normaux

Jusqu'à maintenant, toutes nos études ont été effectuées sur des cellules pancréatiques tumorales. Intrigués à savoir si le phénomène se répétait dans les

cellules pancréatiques normales, nous avons entrepris des études sur des acini pancréatiques fraîchement isolés. Comme les acini ont une très courte durée de vie, nous avons dû nous limiter aux effets à court terme de nos agents anti-mitogéniques ou plus précisément, l'effet de l'AMPc sur l'activité des p42/p44 MAPKs. Tout comme nous l'avons fait pour les cellules pancréatiques tumorales, nous avons pré-traité 30min les acini avec les agents favorisant la formation d'AMPc (Larose *et al.*, 1989), soit la forskoline + IBMX, et la sécrétine, employée seule, à deux concentrations différentes. Nous avons ensuite stimulé pendant 10min ou 2h les acini avec un agent mitogénique reconnu pour le pancréas (Rivard *et al.*, 1994), la caeruleine, un analogue de la CCK. Les protéines issues de cette expérience ont été séparées sur gel SDS-PAGE et l'activité des p42/p44 MAPKs a été évaluée à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée donc active de ces enzymes. De plus, étant donné l'effet de la caeruleine sur la sécrétion des enzymes pancréatiques, nous avons fait un immunobuvardage avec un anticorps qui reconnaît les formes phosphorylée et non-phosphorylée des p42/p44 MAPKs pour s'assurer que notre modulation d'activité n'était pas le reflet d'une variation protéique due à une sortie massive d'enzymes suite à la stimulation par la caeruleine.

En accord avec ce qui avait déjà été publié par Duan et Williams (1994), la caeruleine a augmenté l'activité des p42/p44 MAPKs de 1.9 fois après 10min

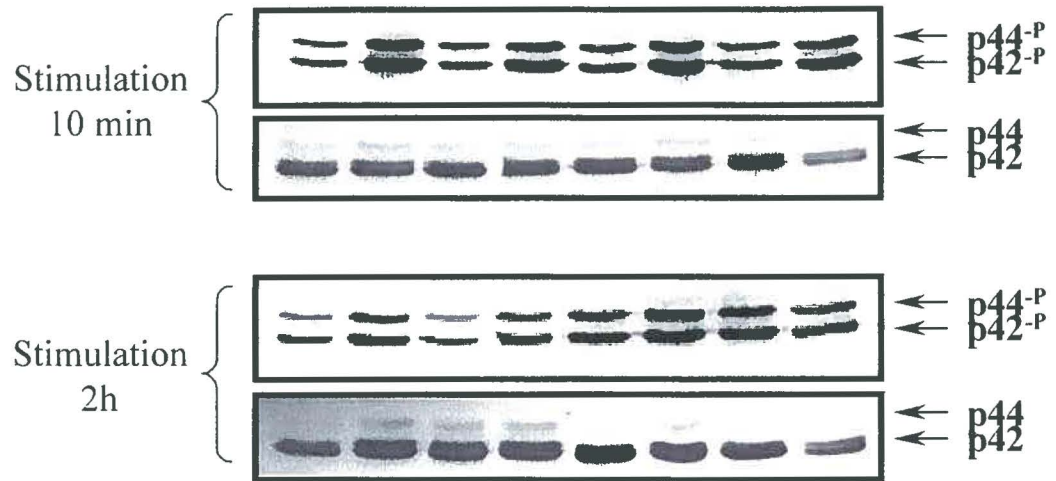


**Figure 18. Effet de la caeruleine, de la forskoline + IBMX (F + I) et de la sécrétine sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les acini pancréatiques**

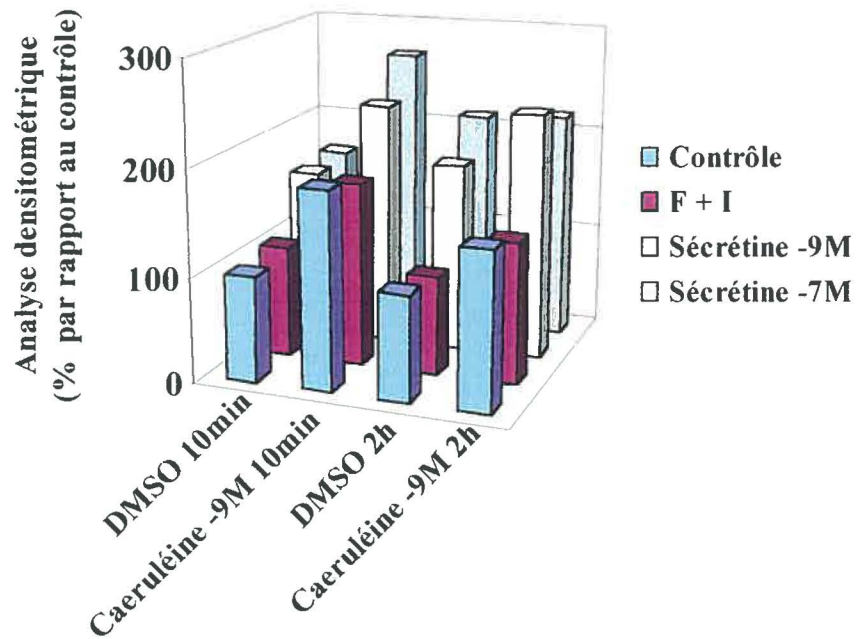
Les acini pancréatiques ont été pré-traités 30min avec 4µg/mL de forskoline + 1mM IBMX,  $10^{-9}$  M et  $10^{-7}$  M de sécrétine puis stimulés avec  $10^{-9}$  M de caeruleine pour une période de 10min ou 2h. 40µg de protéines ont par la suite été soumis à une séparation par SDS-PAGE 10% et analysés par immunobuvardage avec un anticorps (1/500) qui reconnaît la forme phosphorylée des p42/p44 MAPKs puis un anticorps qui reconnaît la forme active et inactive des p42/p44 MAPKs (1/3000) qui a servi de contrôle (A.) B. L'histogramme représente l'analyse densitométrique des résultats obtenus en A. soit l'activité des p42/p44 MAPKs sur la quantité totale de p42/p44 MAPKs.

A.

Caeruléine $10^{-9}$ M:	-	+	-	+	-	+	-	+
F + I:	-	-	+	+	-	-	-	-
Sécrétine $10^{-9}$ M:	-	-	-	-	+	+	-	-
Sécrétine $10^{-7}$ M:	-	-	-	-	-	-	+	+



B.



et de 1.5 fois après 2h de stimulation (fig. 18A et 18B). Cette activation soutenue est en connivence avec les données sur l'effet des agents mitogéniques sur l'activité des p42/p44 MAPKs (Kahan *et al.*, 1992; Meloche *et al.*, 1992; Vouret-Craviari *et al.*, 1993). La forskoline + IBMX n'a pratiquement pas eu d'effet sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les acini pancréatiques non-stimulés à la caeruleine, mais a inhibé très légèrement, d'environ 10%, l'activité induite par la caeruleine après 10min et 2h. Quant à la sécrétine, on a plutôt observé une augmentation de l'activité des p42/p44 MAPKs dans les acini traités avec cette hormone, aux deux concentrations de  $10^{-9}$ M et de  $10^{-7}$ M, autant chez les acini non-stimulés (de 60% et 64% respectivement par rapport aux acini non stimulés après 10min et de 80% et 112% après 2h) que stimulés avec la caeruleine (de 24% et 43% respectivement dans les acini stimulés à la caeruleine pendant 10min et de 57% et 45% après 2h de stimulation).

#### 8. Effet de l'inhibition des p42/p44 MAPKs par le PD98059 sur la prolifération cellulaire des MIA PaCa-2

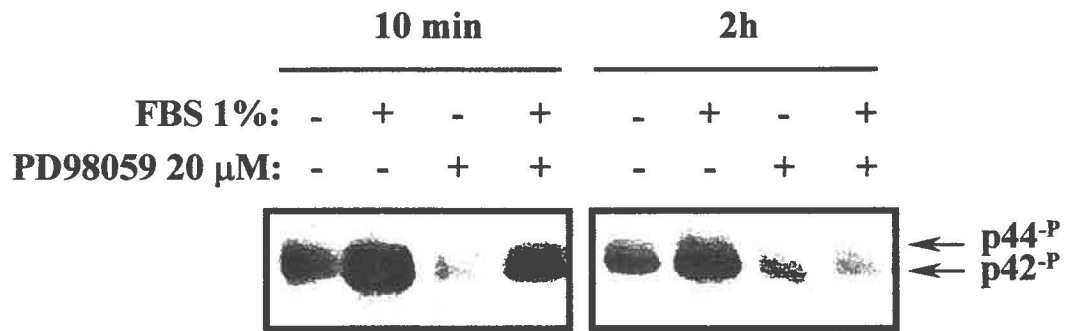
La deuxième partie de mon projet avait pour objectif de clarifier le rôle des p42/p44 MAPKs dans la prolifération et la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines. À l'aide d'un inhibiteur spécifique des MEKs (PD98059), les activateurs en amont des p42/p44 MAPKs (Alessi *et al.*, 1995;

## **Figure 19. Effet du PD98059 sur la progression des cellules MIA**

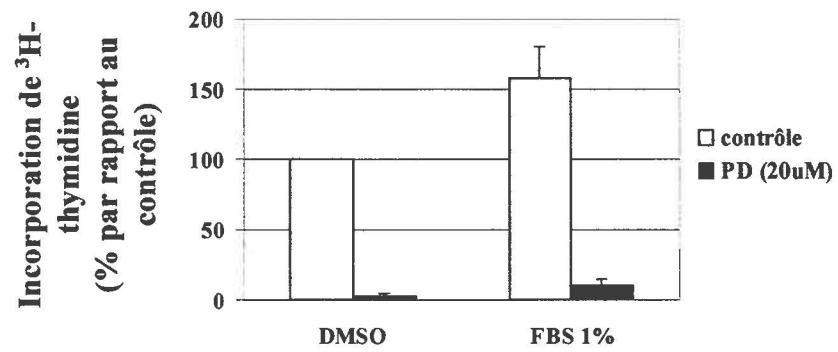
### **PaCa-2 dans le cycle cellulaire**

**A.** 60µg de protéines des lysats issus des cellules pré-traitées pendant 30 min avec 0.001% DMSO ou 20µM PD98059 puis stimulées avec 1% FBS pendant 10min ou 2h ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE 10% et analysés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps (1/500) qui reconnaît spécifiquement la forme phosphorylée (active) des p42/p44 MAPK **B.** Les cellules ont été stimulées ou non pendant 22h avec 20µM PD98059 ± 1% FBS. Durant les deux dernières heures, 1µCi de <sup>3</sup>H-thymidine a été ajouté afin de mesurer la réinitiation de la synthèse d'ADN. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle stimulé avec 0.001% DMSO. **C.** 60µg de protéines des lysats issus des cellules traitées avec 0.001% DMSO, 20µM PD98059 ± 1% FBS pendant 16h ont été séparés par SDS-PAGE 12.5% puis analysés pour évaluer l'expression de p27<sup>Kip1</sup> par immunobuvardage (anticorps = 1/1000).

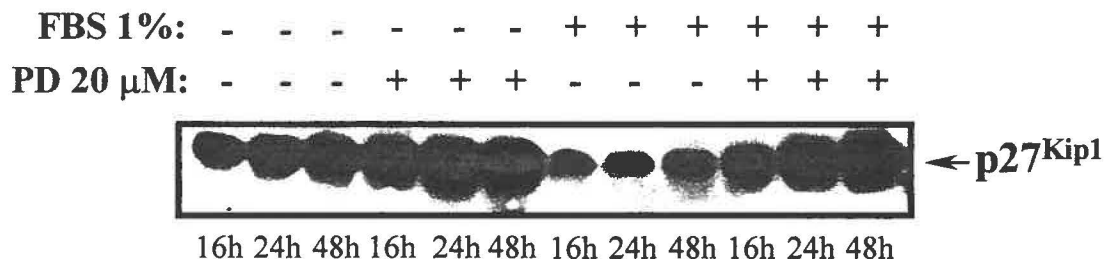
A.



B.



C.



Dudley *et al.*, 1995), nous avons bloqué sélectivement cette voie de signalisation. La figure 19A nous confirme que la pré-incubation de 30min des cellules MIA PaCa-2 avec 20μM de PD98059 a inhibé rapidement (10min) et d'une façon soutenue (au moins 2h) l'activité des p42/p44 MAPKs dans les cellules privées de sérum et dans les cellules stimulées par le sérum 1%. Cette inhibition des p42/p44 MAPKs est associée à une réduction dramatique (95%) de l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine autant chez les cellules non-stimulées que stimulées au sérum 1% pendant 22h (fig. 19B). Également, l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>Kip1</sup> est augmentée respectivement de 40%, 41% et 27% en présence de 20μM PD98059 pendant 16h, 24h et 48h. L'ajout du PD98059 aux cellules cultivées en présence de sérum 1% a inhibé complètement la dégradation de p27<sup>Kip1</sup> observée lors d'une stimulation avec le sérum 1% (fig. 19C).

#### 9. Effet d'une inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs sur la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines

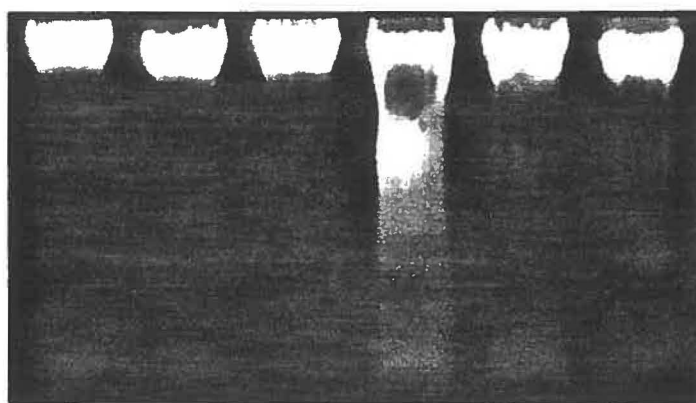
Comme les conséquences à court terme d'une inhibition des p42/p44 MAPKs étaient non négligeables, nous avons vérifié l'effet d'une inhibition de cette voie de signalisation sur la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines. Les résultats de la figure 20 nous indiquent que le traitement prolongé (48h) des cellules MIA PaCa-2 (fig.20A) et des cellules BxPC-3 (fig.

**Figure 20. Effet de l'inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs sur la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines**

L 'ADN des cellules traitées pendant 24h, 48h ou 72h avec 0.001% DMSO (-) ou 20µM PD98059 a été extrait et 30µg ont été portés sur gel afin d'être visualisés par coloration au bromure d'éthidium. A. MIA PaCa-2 B. BxPC-3 C. PANC-1

**A.**

<b>FBS 1%:</b>	-	-	-	-	+	-
<b>FBS 10%:</b>	-	-	-	-	-	+
<b>PD98059 20 <math>\mu</math>M:</b>	-	-	+	+	+	+



24h    48h    24h    48h    48h    48h

**B.**

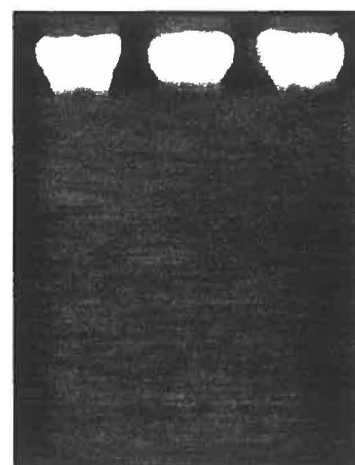
**C.**

**PD 20  $\mu$ M:**    -    +



48h    48h

**PD 20  $\mu$ M:**    -    +    +



48h    48h    72h



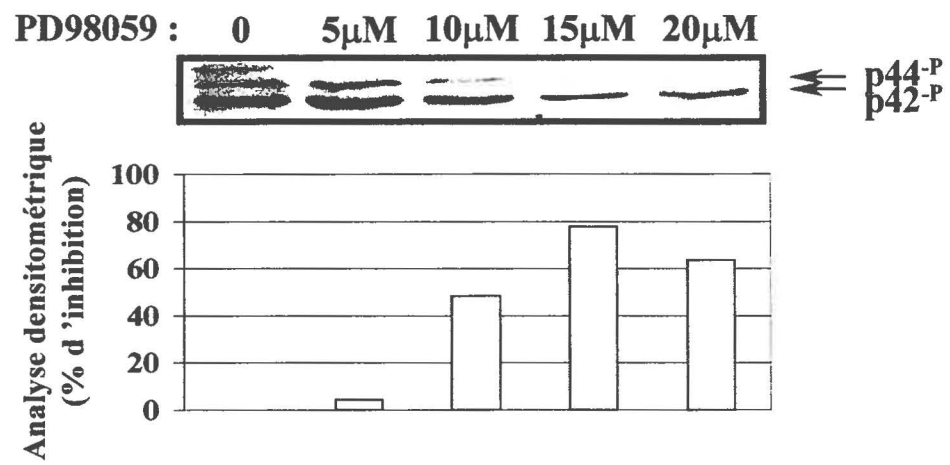
20B) cultivées en absence de sérum avec 20 $\mu$ M de PD98059 a résulté en une fragmentation de l'ADN, un marqueur des cellules qui ont entamé un processus apoptotique (Loo et Rimmela, 1998). Les cellules PANC-1 semblent plus résistantes à cette concentration de PD98059 puisque le traitement n'occasionne aucune fragmentation de l'ADN même après 72h (fig. 20C). Il est à noter qu'à l'exception des BxPC-3 (fig. 20B), les cellules privées de facteurs de croissance exogènes ne montrent aucune fragmentation de l'ADN suggérant qu'elles sont aptes à survivre dans de telles conditions. Une autre observation importante est la protection contre cette fragmentation de l'ADN apportée par aussi peu que 1% sérum, mais aussi par 10% sérum (fig. 20A).

La réponse apoptotique des cellules MIA PaCa-2 au PD98059 semble requérir un certain niveau d'inhibition des p42/p44 MAPKs ainsi qu'une durée minimum de cette inhibition. En effet, la figure 21A nous montre les degrés d'inhibition des p42/p44 MAPKs atteints par des concentrations croissantes de PD98059 après 48h de traitement des cellules MIA PaCa-2 (5% d'inhibition par 5 $\mu$ M de PD98059, 49% par 10 $\mu$ M, 78% par 15 $\mu$ M et 64% par 20 $\mu$ M). Ces degrés d'inhibition concordent avec la fragmentation de l'ADN observée après 48h de traitement avec ces mêmes concentrations d'inhibiteur (fig. 21B) où l'on observe de la fragmentation de l'ADN qu'à partir de 15 $\mu$ M de PD98059. Cela suggère qu'il existe un seuil d'activité p42/p44 MAPKs qui détermine si la cellule entre dans un processus apoptotique ou si elle demeure viable. Un

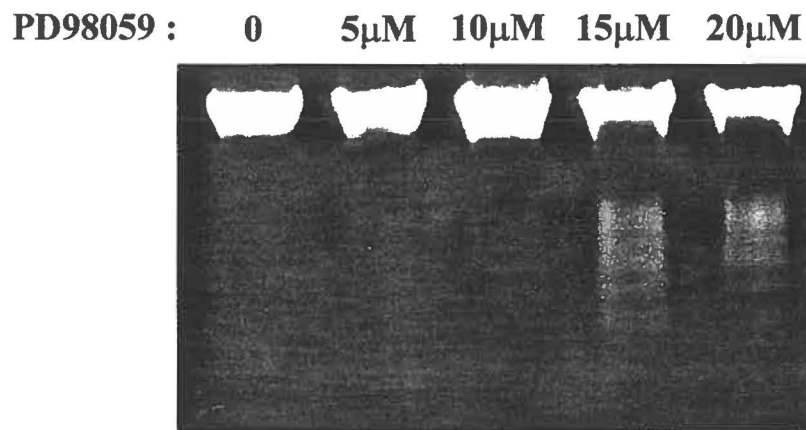
**Figure 21. Effet du niveau et de la durée de l'inhibition des p42/p44  
MAPKs sur la réponse apoptotique observée dans les cellules  
pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2 suite au traitement  
avec le PD98059**

Les cellules ont été traitées pendant 48h avec 0.001% DMSO (0) ou avec des concentrations croissantes de PD98059. **A.** 40µg de protéines issues des cellules traitées ont été séparés par SDS-PAGE 10% et l'activité des p42/p44 MAPKs a été analysée (anticorps 1/500). **B.** L'ADN des cellules traitées a été extrait et 30µg ont été portés sur gel d'agarose 1.5% afin d'être visualisés par coloration au bromure d'éthidium. **C.** Les cellules ont été traitées 48h avec 0.001% DMSO, 20µM PD98059 ou 24h avec 20µM PD98059 puis rincées deux fois avec du milieu sans FBS et réincubées pour une période de 24h avec 0.001% DMSO. 30µg d'ADN des cellules traitées ont été portés sur gel d'agarose 1.5% et visualisés par coloration au bromure d'éthidium.

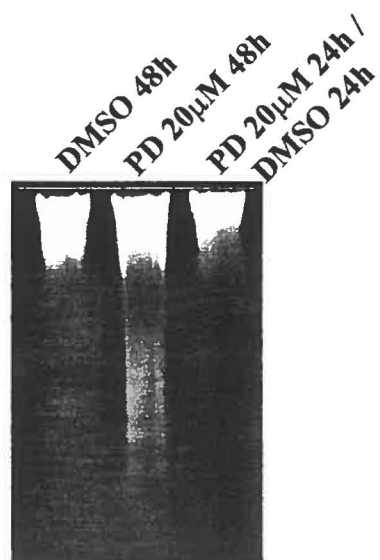
A.



B.



C.



petit test nous a permis de conclure qu'une inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs était nécessaire pour diriger les cellules vers la mort cellulaire programmée. D'une part, aucune fragmentation de l'ADN n'a été visualisée après 24h de traitement au PD98059 ( fig. 20A). D'autre part, si on traite les cellules pendant 24h avec le PD98059, qu'on rince convenablement avec du milieu sans sérum et qu'on réincube les cellules dans du milieu exempt de sérum pendant une seconde période de 24h, aucune fragmentation de l'ADN n'est observée (fig. 21C).

#### 10. Effet d'une inhibition des p42/p44 MAPKs sur l'activité des autres cascades MAPKs

Le peu d'études suggérant un rôle des p42/p44 MAPKs dans la survie cellulaire démontrent, la plupart du temps, que c'est une balance des différentes cascades MAPKs qui détermine le devenir de la cellule : les p42/p44 MAPKs promouvant la survie cellulaire et les p38 MAPK et JNKs favorisant la mort cellulaire programmée (Xia *et al.*, 1995). Pour s'assurer que la fragmentation de l'ADN observée suite au traitement des cellules avec le PD98059 n'était pas une conséquence de l'activation d'une autre cascade MAPK, nous avons dosé l'activité de la p38 MAPK et des JNKs dans les cellules traitées avec le PD98059. Comme on peut le voir à la figure 22, aucune modulation de l'activité de la p38 MAPK (fig. 22A) et des JNKs (fig. 22B) n'a été détectée

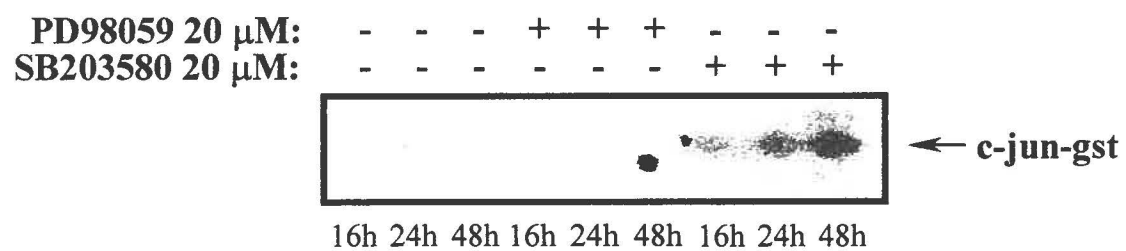
**Figure 22. Effet de l'inhibition des p42/p44 MAPKs sur l'activité de la p38 MAPK et des JNKs dans les cellules MIA PaCa-2**

**A.** Les cellules ont été traitées avec 0.001% DMSO (-) ou 20 $\mu$ M PD98059 pendant 16h, lysées puis la p38 MAPK a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps spécifique (8/1000). L'activité kinase a pu être évaluée par la mesure de l'AT<sup>32</sup>P incorporé dans le MBP (myelin basic protein) utilisé comme substrat et visualisé par autoradiographie. **B.** Les cellules ont été traitées 16h, 24h, et 48h avec 0.001% DMSO, 20 $\mu$ M PD98059  $\pm$  20 $\mu$ M SB203580, lysées, JNK a été précipitée à l'aide de la protéine de fusion c-jun-gst et l'activité a été dosée en évaluant la radioactivité (AT<sup>32</sup>P) incorporée dans c-jun-gst par autoradiographie.

**A.**



**B.**



dans nos cellules mises en présence de PD98059. Pour le dosage de l'activité des JNKs, le SB203580, un inhibiteur spécifique de la p38 MAPK (Lee *et al.*, 1994), stimule l'activité des JNK dans les cellules MIA PaCa-2 d'une manière encore inconnue, et, pour cette raison, il a été utilisé comme contrôle positif d'une activité JNK.

#### 11. Effet de l'inhibition des p42/p44 MAPKs sur l'expression des homologues Bcl-2

Les homologues Bcl-2 constituent une famille de protéines centrales dans la régulation de la mort cellulaire programmée. On sait que le ratio entre les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de cette famille de protéines influence le devenir de la cellule (Farrow et Brown, 1996). Ainsi, afin de décortiquer le processus d'apoptose que l'on a observé et afin d'en élucider les mécanismes, nous avons déterminé si le PD98059 influençait l'expression de plusieurs homologues Bcl-2.

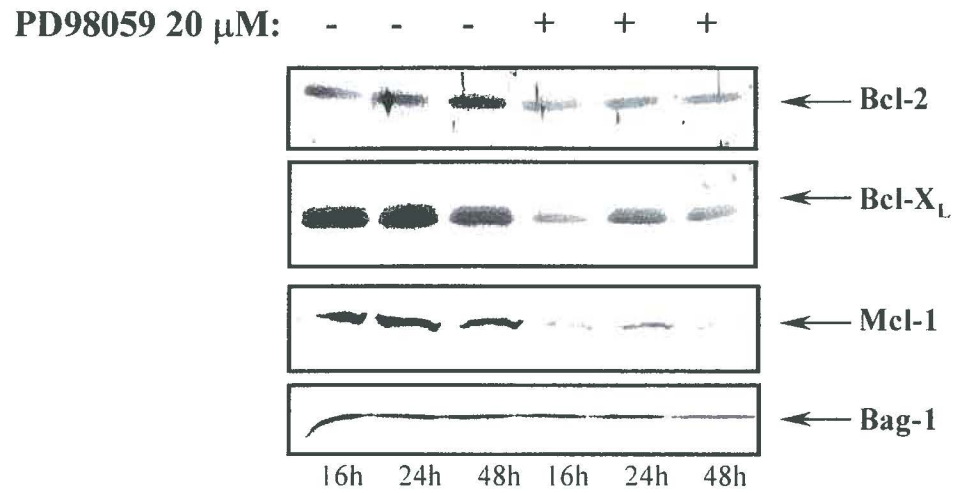
Le traitement des cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2 au PD98059 a affecté le niveau d'expression de tous les membres Bcl-2 anti-apoptotiques analysés (fig. 23) : le niveau d'expression de Bcl-2 a été diminué de 32%, 38% et 39% après 16h, 24h, et 48h de traitement avec le PD98059, celle de Bcl-X<sub>L</sub> de 74%, 45%, et 61%, celle de Mcl-1 de 28%, 57% et 71% et

**Figure 23. Régulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques par le PD98059 dans les cellules MIA PaCa-2**

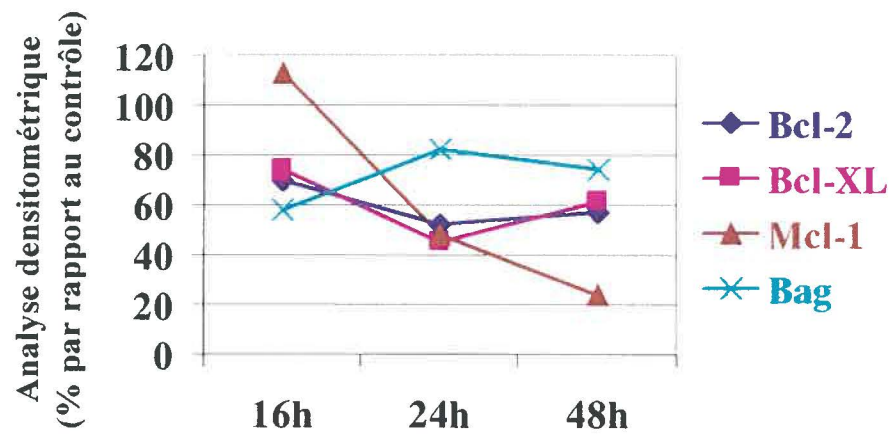
Les cellules ont été traitées pendant 16h, 24h ou 48h avec 0.001% DMSO (-) ou 20µM PD98059. A. 60µg de protéines issus des cellules traitées ont été séparés par SDS-PAGE 12.5% et l'expression de Bcl-2 (1/1000), Bcl-X<sub>L</sub> (1/1000), Mcl-1(1/200) et Bag-1 (1/1000) a été évaluée. B. Représentation graphique exprimée en pourcentage par rapport à chacun des contrôles de la variation d'expression des différents homologues anti-apoptotiques en fonction du temps.



A.



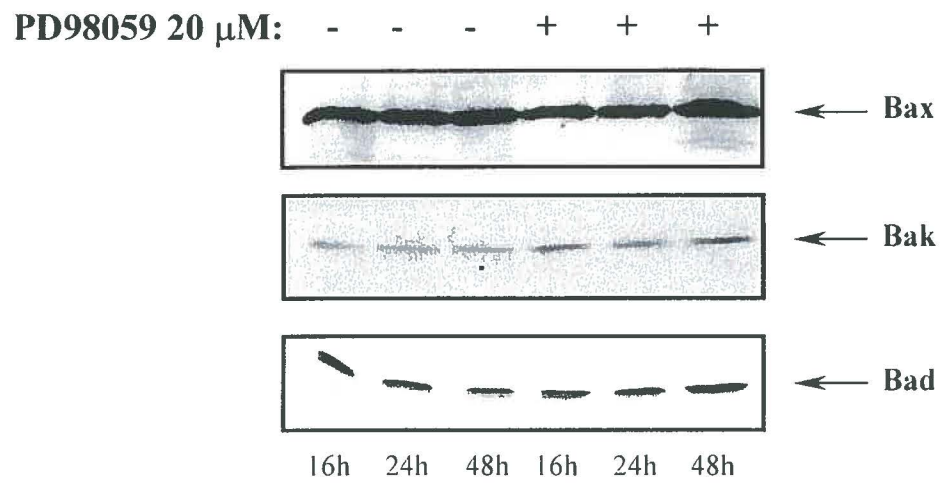
B.



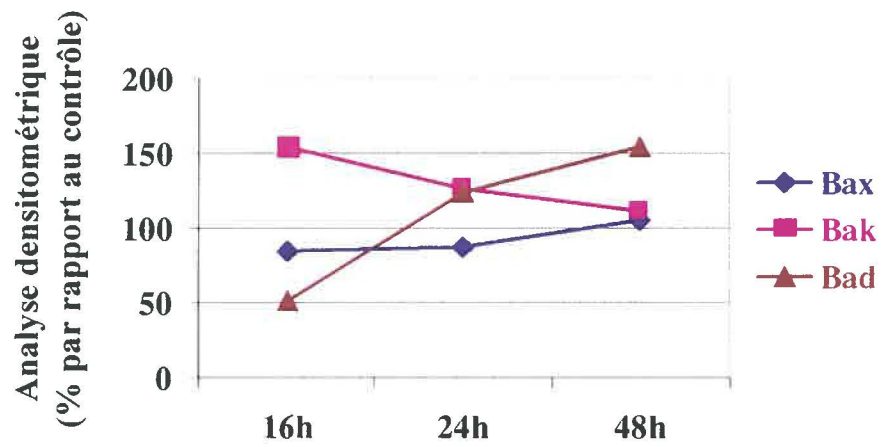
**Figure 24. Régulation de l'expression des homologues pro-apoptotiques Bcl-2 par le PD98059 dans les cellules MIA PaCa-2**

Les cellules ont été traitées pendant 16h, 24h ou 48h avec 0.001% DMSO (-) ou 20µM PD98059. A. 60µg de protéines issus des cellules traitées ont été séparés par SDS-PAGE 12.5% et l'expression de Bax (1/1000), Bak (1/1000) et Bad (1/1000) a été évaluée. B. Représentation graphique exprimée en pourcentage par rapport à chacun des contrôles de la variation d'expression des différents homologues pro-apoptotiques en fonction du temps.

A.



B.



finalement, le niveau d'expression de Bag-1, une protéine liant Bcl-2 bien connu pour ces effets anti-apoptotiques, a été diminuée de 42%, 18% et 26% après 16h, 24h et 48h d'incubation avec l'inhibiteur de la MEK.

Quant aux homologues pro-apoptotiques Bax, Bak et Bad, leur niveau d'expression a varié beaucoup moins que celle des membres anti-apoptotiques (fig. 24). Le niveau d'expression de Bax ne semble pas avoir varié. Néanmoins, on observe une augmentation d'environ 50% du niveau d'expression de Bak après 16h de traitement avec le PD98059 qui revient au niveau contrôle à 48h, tandis que le niveau d'expression de Bad diminue d'environ 50% après 16h de traitement, augmente d'environ 25% après 24h et finalement, culmine après 48h en présence de PD98059 (expression de 50% supérieure au contrôle non-traité).

## 12. Effet du traitement des cellules MIA PaCa-2 au PD98059 sur l'activité des caspases

Les caspases sont considérées comme la machinerie protéolytique de l'apoptose. Nos efforts se sont donc orientés vers la mesure d'une activité caspase afin d'évaluer leur implication dans l'apoptose observée suite au traitement des cellules avec le PD98059.

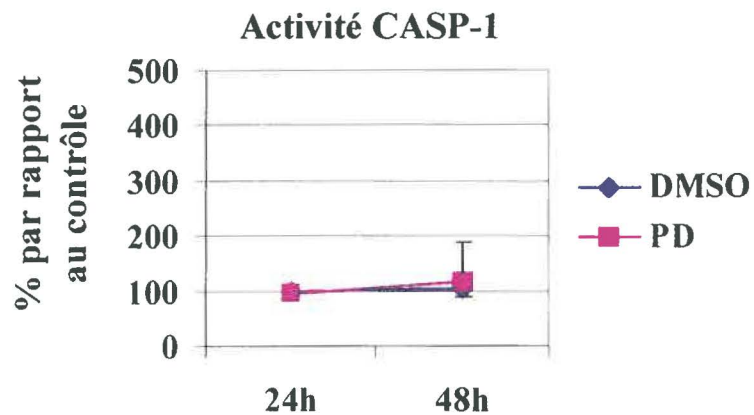
Les résultats de la figure 25 démontrent que le traitement des cellules au PD98059 n'a pas induit d'activité de la famille CASP-1 après 24h et 48h (fig. 25A), mais a accru celle de la famille CASP-3 de près de deux fois dans les cellules traitées pendant 24h au PD98059 et de quatre fois dans les cellules traitées pendant 48h (fig. 25B). Pour confirmer qu'il s'agissait bien d'une activité de la famille CASP-3 que nous dosions, nous avons ajouté lors du dosage un inhibiteur de la famille CASP-3, le z-DEVD-fmk, à un échantillon traité pendant 48h avec le PD98059. Cela a eu pour effet de bloquer complètement l'activité de type caspase-3 induite par le PD98059 (fig.25C).

Les caspases actives peuvent hydrolyser plusieurs substrats dont l'enzyme de réparation de l'ADN, la poly(ADP)-ribose polymérase (PARP) qui s'avère plus spécifiquement un substrat des caspases -3 et -7 *in vivo* (Lazebnik *et al.*, 1994, Salvesen et Dixit, 1997). À l'aide d'un anticorps qui reconnaît la forme non clivée (113 kDa) et clivée (89kDa) de la PARP, nous avons observé un clivage de cette enzyme lors du traitement des cellules MIA PaCa-2 pendant 48h avec le PD98059 (fig. 26). Ce résultat suggère fortement que l'activité CASP-3 induite par le PD98059 (fig. 25B) conduit au clivage de la PARP qui ne peut désormais accomplir sa fonction de réparation de l'ADN. De plus, comme c'était le cas lors de la fragmentation de l'ADN, l'ajout de sérum 1% (fig. 26A) ou 10% (fig.26B) a inhibé partiellement ou complètement le clivage de la PARP appuyant l'idée que les voies de signalisation activées par le sérum

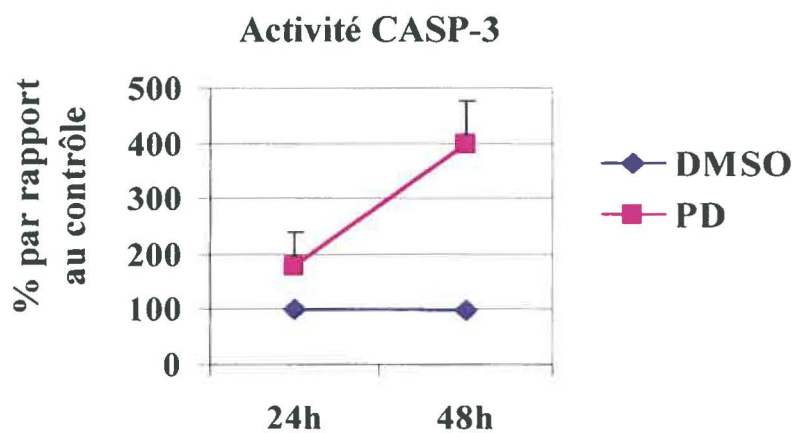
**Figure 25. Effet du traitement des cellules MIA PaCa-2 au PD98059  
sur l'activité de la famille CASP-1 et CASP-3**

Les cellules ont été traitées pendant 24h ou 48h avec 0.001% DMSO ou 20 $\mu$ M PD98059. 25 $\mu$ g de protéines des lysats cellulaires ont été incubées avec 20 $\mu$ M de Ac-YVAD-AMC (substrat de la famille CASP-1) (A.) ou de Ac-DEVD-AMC (substrat de la famille CASP-3) (B.) et l'émission émise par le peptide fluorogénique AMC libéré suite à une activité caspase a été mesurée grâce à un spectrofluoromètre. C. 25 $\mu$ g de protéines des cellules traitées avec le PD pendant 48h ont été incubées avec 50 $\mu$ M de z-DEVD-fmk (un inhibiteur de la famille CASP-3) pendant le dosage effectué comme décrit ci-haut.

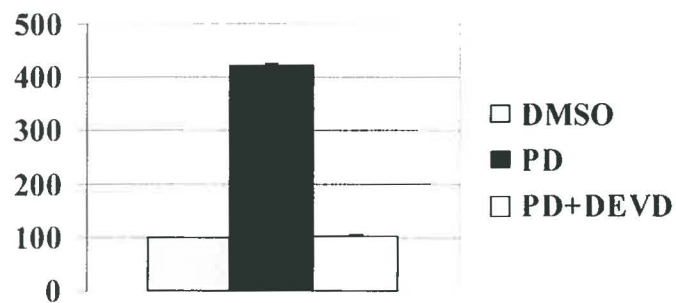
A.



B.



C.

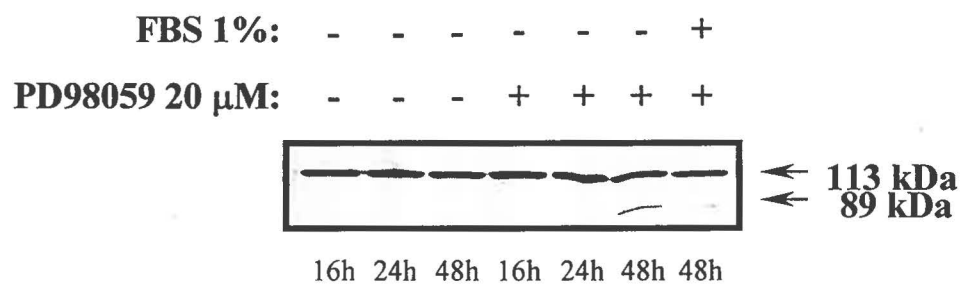


**Figure 26. Effet du PD98059 sur l'expression de la poly(ADP)-ribose polymérase (PARP) chez les cellules MIA PaCa-2**

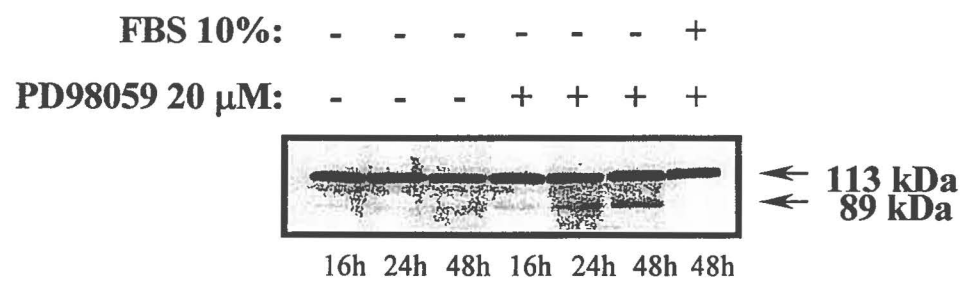
Les cellules ont été traitées pendant 16h, 24, ou 48h avec 0.001% DMSO (-) ou 20 $\mu$ M PD98059  $\pm$  1% FBS (A.) ou 10% FBS (B). 60 $\mu$ g de protéines des cellules traitées ont été séparés par SDS-PAGE 7.5% et analysés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps qui reconnaît les formes non clivé et clivée de la PARP (1/10000).



**A.**



**B.**



**procurent une protection contre l'apoptose induite par le traitement des cellules au PD98059.**

**Pour confirmer le rôle des caspases dans l'induction de l'apoptose induite par le PD98059, nous avons traité les cellules avec des inhibiteurs de caspases. L'inhibiteur de la famille de la CASP-3, le z-DEVD-fmk (50µM et 100µM), a réduit significativement la fragmentation de l'ADN causée par un traitement des cellules MIA PaCa-2 au PD98059 pendant 48h, tandis que l'inhibiteur de la famille de la CASP-1, le z-VAD-fmk, n'a eu qu'un effet partiel à une concentration de 10µM, mais a bloqué complètement la fragmentation de l'ADN lorsqu'utilisé à une concentration de 50µM (fig. 27). De plus, la combinaison des deux inhibiteurs aux plus faibles concentrations utilisées (50µM z-DEVD-fmk + 10µM z-VAD-fmk), a protégé complètement les cellules contre la fragmentation de l'ADN induite par le PD98059.**

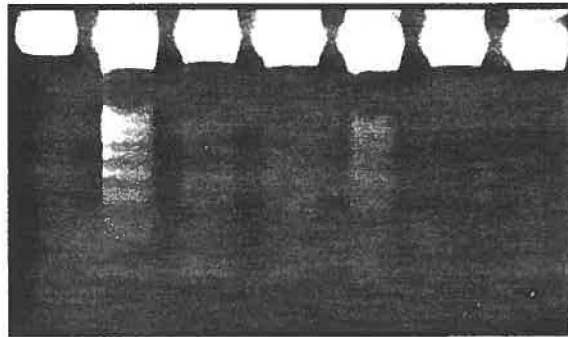
### **13. Effet d'une inhibition des cyclooxygénases sur la survie des cellules MIA PaCa-2**

**Le PD98059 a d'abord été décrit comme un inhibiteur spécifique des MEK1/2 (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995). Cependant, une étude récente a démontré que l'inhibiteur était capable d'inhiber l'activité des**

**Figure 27. Effet des inhibiteurs des familles CASP-1 et CASP-3 sur la fragmentation de l'ADN observée suite au traitement des cellules MIA PaCa-2 au PD98059**

Les cellules ont été traitées pendant 48h avec 0.001% DMSO, 20μM PD98059 ± 50μM z-DEVD-fmk (inhibiteur de la famille CASP-3), 100μM z-DEVD-fmk, 10μM z-VAD-fmk (inhibiteur de la famille CASP-1), 50μM z-VAD-fmk ou 50μM z-DEVD-fmk + 10μM z-VAD-fmk puis l'ADN a été extrait et 30μg ont été portés sur gel d'agarose 1.5% afin d'être visualisés par coloration au bromure d'éthidium.

Inhibiteurs de caspases:	-	-	DEVD 50µM	DEVD 100µM	VAD 10µM	VAD 50µM	DEVD 50µM + VAD 10µM
PD98059 20 uM:	-	+	+	+	+	+	+

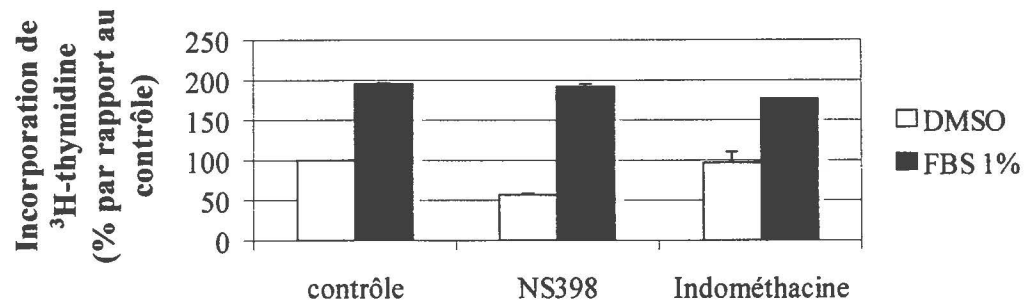


cyclooxygénases 1 (COX-1) et 2 (COX-2) purifiées des plaquettes humaines (Börsch-Haubold *et al.*, 1998). De plus, l'inhibition des COXs a déjà été associée à l'apoptose dans une lignée cellulaire tumorale prostatique humaine (Liu *et al.*, 1998), dans les xénogreffes de cancers gastriques (Sawaoka *et al.*, 1998) et dans les cellules épithéliales intestinales (Tsujii et DuBois, 1995). Étant donné ces résultats, nous nous devions de vérifier le rôle potentiel de l'inhibition des COXs dans l'induction de l'apoptose dans les cellules pancréatiques tumorales humaines traitées avec le PD98059. Pour ce faire, nous avons employé un inhibiteur spécifique de la COX-2, le NS398, ainsi qu'un inhibiteur non sélectif des COX-1 et COX-2, l'indométhacine. Les concentrations utilisées pour chacun des inhibiteurs ont déjà été montrées pour inhiber complètement l'activité des COXs (Lora *et al.*, 1998). En plus d'une absence d'effet sur l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine (fig. 28A), le traitement des cellules pendant 48h au NS398 ou à l'indométhacine n'a jamais causé le clivage de la PARP (fig. 28B). Ainsi, même si le PD98059 peut inhiber l'activité des COXs, cet effet n'est pas la cause de l'apoptose observée suite au traitement des cellules avec l'inhibiteur de la MEK.

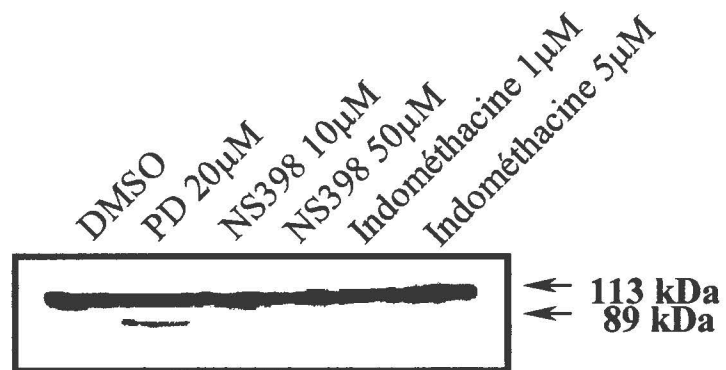
**Figure 28. Effet d'une inhibition des cyclooxygénases, COX-1 et COX-2, sur la viabilité des cellules MIA PaCa-2**

**A.** Les cellules ont été stimulées pendant 22h avec 0.001% DMSO, 10µM NS398 (inhibiteur de la COX-2) ± 1% FBS ou 1µM indométhacine (inhibiteur non sélectif des COXs) ± 1% FBS . Durant les deux dernières heures, 1µCi de <sup>3</sup>H-thymidine a été ajouté afin de procéder à une mesure de la réinitiation de synthèse d'ADN. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle stimulé avec le 0.001% DMSO. **B.** 40µg de protéines des lysats de cellules traitées pendant 48h avec 0.001% DMSO, 20µM PD98059, 10µM NS398, 50µM NS398, 1µM indométhacine, 5µM indométhacine ont été séparés par SDS-PAGE 7.5% et analysés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la PARP (1/10000).

A.



B.



#### **14. Effet d'une hyperactivation des p42/p44 MAPKs sur l'apoptose induite par le PD98059**

Nous avons démontré jusqu'à présent que l'inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs menait à la mort cellulaire programmée. Si tous les effets observés sont effectivement sous la dépendance de l'activité des p42/p44 MAPKs, il est logique de penser qu'une hyperactivation de celles-ci préviendra l'apoptose causée par le PD98059.

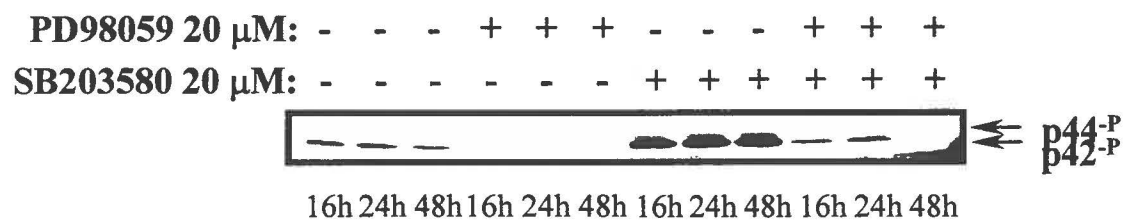
Dans le but de prouver le rôle des p42/p44 MAPKs dans le processus d'apoptose occasionné par un traitement des cellules MIA PaCa-2 au PD98059, nous avons stimulé les p42/p44 MAPKs à l'aide du SB203580, un inhibiteur de la p38 MAPK (Lee *et al.*, 1994), mais qui stimule également, de façon soutenue, les p42/p44 MAPKs dans les cellules MIA PaCa-2 (fig. 29A). Ceci est en accord avec de récentes études démontrant que le SB203580 est apte à stimuler Raf-1 et à initier la cascade menant à l'activation des p42/p44 MAPKs (Hall-Jackson *et al.*, 1999; Kalmes *et al.*, 1999). En plus d'indiquer que le PD98059 inhibe de façon prolongée (16h, 24h et 48h) l'activité des p42/p44 MAPKs (mais sans l'inhiber complètement; en effet une exposition supérieure du film nous permettrait de distinguer également la p44 MAPK qui semble ici complètement inhibée par le PD98059), la figure 29A nous indique que



**Figure 29. Effet du SB203580 sur l'activité des p42/p44 MAPKs, sur la fragmentation de l'ADN et sur l'expression des homologues Bcl-2 dans les cellules MIA PaCa-2 traitées au PD98059**

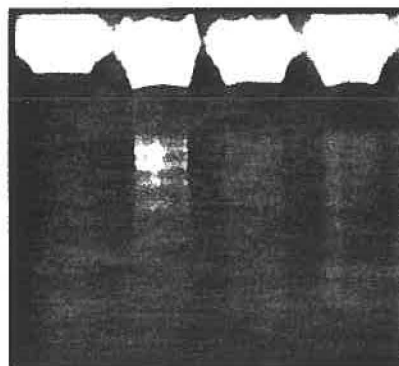
**A.** 60µg des protéines des lysats des cellules stimulées pendant 16h, 24h ou 48h avec 0.001% DMSO (-), 20µM PD98059 ± 20µM SB203580 ont été séparés par SDS-PAGE 10% et analysés par immunobuvardage avec un anticorps qui reconnaît la forme phosphorylée des p42/p44 MAPKs (1/500). **B.** 30µg d'ADN des cellules traitées 48h avec 0.001% DMSO, 20µM PD98059 ± 20µM SB203580 ont été visualisés par coloration au bromure d'éthidium après avoir migré sur un gel d'agarose 1.5%. **C.** 60µg de protéines des lysats de cellules traitées pendant 24h ou 48h avec 0.001% DMSO, 20µM PD98059 ± 20µM SB203580 ont été séparés par SDS-PAGE 12.5% et analysés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps qui reconnaissent Bcl-2 (1/1000), Bcl-X<sub>L</sub> (1/1000) et Mcl-1 (1/200).

A.



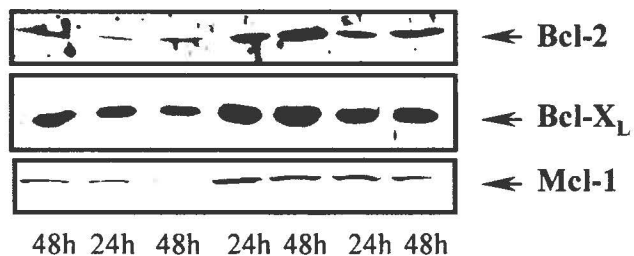
B.

PD98059 20 $\mu$ M:	-	+	-	+
SB203580 20 $\mu$ M:	-	-	+	+



C.

PD98059 20 $\mu$ M:	-	+	+	-	-	+	+
SB203580 20 $\mu$ M:	-	-	-	+	+	+	+

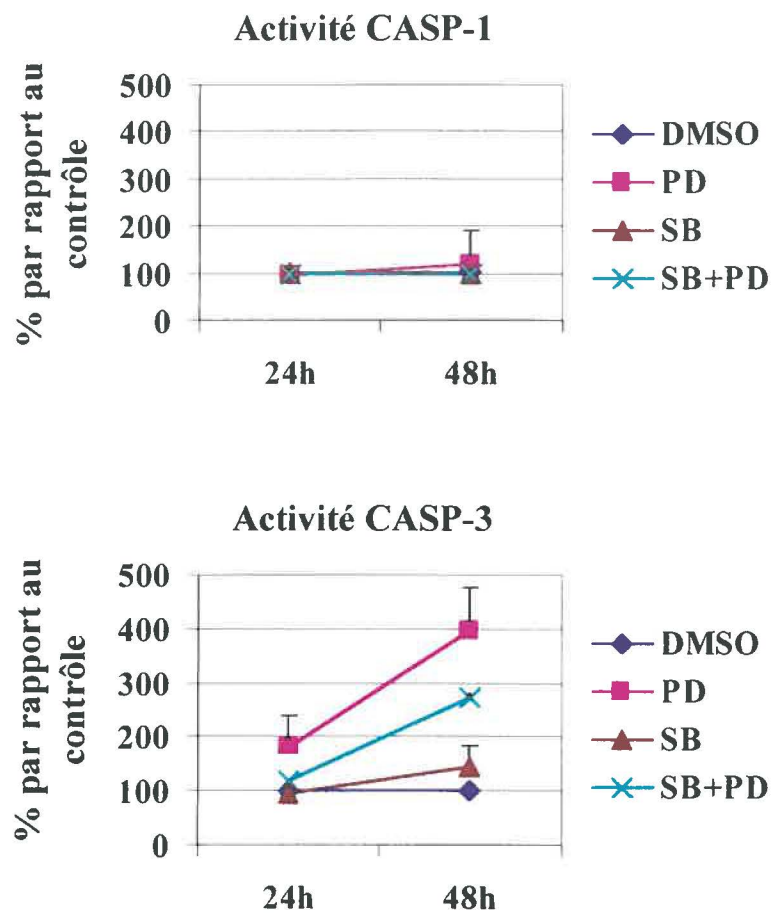


**l'activité p42/p44 MAPKs est revenue au niveau contrôle lorsque les cellules ont été mises en présence des deux inhibiteurs, le PD98059 et le SB203580. Étant donné que le SB203580 surstimule de façon importante les p42/p44 MAPKs, probablement que le PD98059 à une concentration de 20µM n'est pas suffisant pour réduire l'activité des p42/p44 MAPKs comme dans les cellules traitées au PD98059 seulement. Sûrement qu'une augmentation de la concentration de PD98059 dans les cellules traitées au SB203580 nous permettrait de réduire davantage l'activité des p42/p44 MAPKs amenée par une stimulation de Raf-1 (par le SB203580), mais il faut alors se méfier des trop fortes concentrations de PD98059 qui inhibent aussi la synthèse protéique. Au niveau de la fragmentation de l'ADN, le SB203580 employé seul n'a pas eu d'effet et, en combinaison avec le PD98059, il a bloqué efficacement la fragmentation induite par ce dernier (fig. 29B). Cette stimulation des p42/p44 MAPKs par le SB203580, en plus d'augmenter l'expression des homologues anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et Mcl-1, a freiné la diminution d'expression de ces homologues entraînée par le traitement des cellules avec le PD98059 (fig. 29C). À noter que seuls les homologues ayant variés lors du traitement avec le PD98059 ont été analysés. Le SB203580 a également affecté les caspases ; tout en laissant intacte l'activité de type CASP-1, il a inhibé de 30% l'activité de type CASP-3 induite par le PD98059 après 48h de traitement (fig. 30A). De plus, il a prévenu efficacement le clivage de la PARP (fig. 30B).**

**Figure 30. Effet du SB203580 sur l'activité de la famille CASP-1 et de la CASP-3 ainsi que sur le clivage de la PARP induits par le PD98059 dans les cellules MIA PaCa-2**

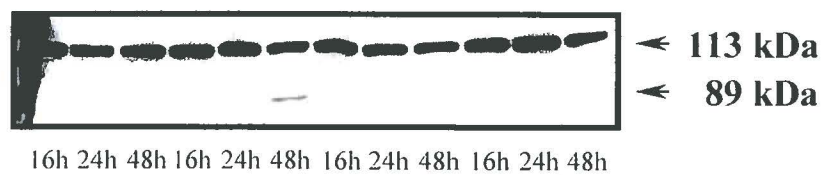
**A.** Les cellules ont été traitées pendant 24h ou 48h avec 0.001% DMSO ou 20 $\mu$ M PD98059  $\pm$  20 $\mu$ M SB203580. 25 $\mu$ g de protéines ont été incubés avec 20 $\mu$ M de Ac-YVAD-AMC, un substrat de la caspase-1 (graphique du haut), ou de Ac-DEVD-AMC, un substrat de la caspase-3 (graphique du bas), et l'émission émise par le peptide fluorogénique AMC libéré suite à une activité caspase a été mesurée grâce à un spectrofluoromètre. **B.** 60 $\mu$ g de protéines des lysats de cellules traitées pendant 16h, 24h ou 48h avec 0.001% DMSO (-), 20 $\mu$ M PD98059  $\pm$  20 $\mu$ M SB203580 ont été séparés par SDS-PAGE 7.5% et analysés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la PARP (1/10000).

A.



B.

PD98059 20  $\mu$ M: - - - + + + - - - + + +  
 SB203580 20  $\mu$ M: - - - - - - + + + + + +



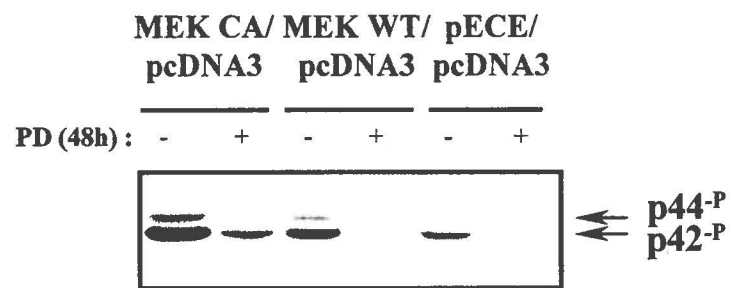
Une autre façon d'augmenter l'activité des p42/p44 MAPKs a impliqué la construction d'un clone stable de MIA PaCa-2 exprimant une MEK constitutivement active (MEK CA). Il est bon de mentionner ici que la MEK CA tire son activité constitutive par le fait que des acides aspartiques remplacent les sérines 218 et 222 habituellement phosphorylées par Raf et ainsi, ces acides aspartiques miment la charge négative normalement amenée par la phosphorylation de Raf-1 (Pagès *et al.*, 1994). Comme l'inhibiteur PD98059, en se liant à la MEK, inhibe sa phosphorylation par Raf (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995), on peut s'imaginer que le PD98059 aura plus de difficulté à inhiber une MEK qui ne dépend pas de sa phosphorylation par Raf pour être active. Agissant comme contrôles, un clone stable exprimant le vecteur vide pECE ainsi qu'un autre clone exprimant une MEK de type sauvage (MEK WT) ont été utilisés. La figure 31A nous indique que 1- l'activité des p42/p44 MAPKs du clone MEK CA est supérieure à l'activité dans les clones pECE et MEK WT; 2- l'activité des p42/p44 MAPKs qui demeure suite au traitement du clone MEK CA avec le PD98059 est supérieure à l'activité des p42/p44 MAPKs dans les clones pECE et MEK WT traités au PD98059 et est comparable à l'activité p42/p44 MAPKs du clone stable pECE non traité au PD98059; 3- les cellules exprimant la MEK CA semblent plus résistantes à l'effet du PD98059 utilisé à une concentration de 20 $\mu$ M car la fragmentation de l'ADN est moins importante que celle observée dans les cellules traitées au PD98059 et exprimant le vecteur vide (pECE) ou la MEK

**Figure 31. Effet d'un mutant constitutif actif de la MEK1 sur la fragmentation de l'ADN induite par 20 $\mu$ M PD98059 dans les cellules MIA PaCa-2**

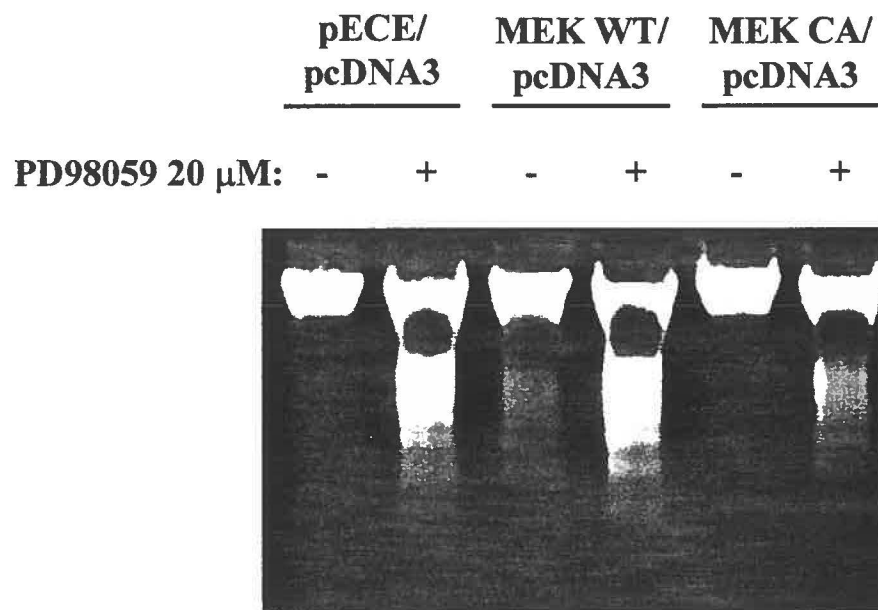
Les cellules ont été co-transfectées de façon stable avec le vecteur de sélection pcDNA3 et le vecteur vide pECE vide, MEK WT ou MEK CA.

**A.** 60 $\mu$ g de protéines issus des lysats des cellules traités ou non avec 20 $\mu$ M PD98059 pendant 48h ont été séparés par SDS-PAGE 10% et analysés avec un anticorps (1/500) dirigé contre la forme active des p42/p44 MAPKs **B.** Les différents clones ont été traités 48h avec 20 $\mu$ M PD98059. 30 $\mu$ g d'ADN extrait ont été portés sur gel d'agarose 1.5% et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. **C.** 60 $\mu$ g de protéines issus des lysats des cellules traitées pendant 24h ou 48h au PD98059 ont été séparés par SDS-PAGE 7.5 % et analysés avec un anticorps (1/10000) qui reconnaît la PARP.

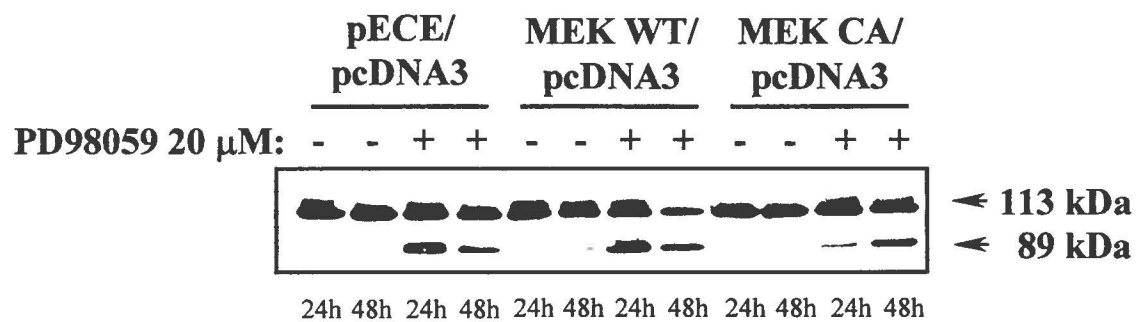
A.



B.



C.





WT (fig. 31B); 4- finalement, l'analyse de la PARP dans les différents clones (pECE, MEK WT et MEK CA) nous indique que l'expression d'une MEK CA a retardé son clivage d'environ 24h (fig. 28C).

#### 15. Effet d'une inhibition du protéasome sur les cellules MIA PaCa-2 traitées au PD98059

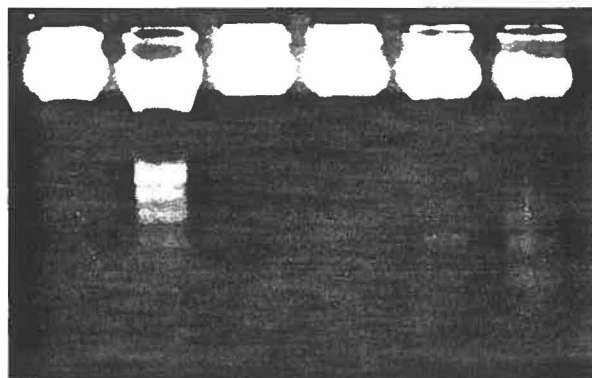
Jusqu'ici, nos résultats ont clairement démontré que c'est l'inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs qui est néfaste à la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2. Puisque le phénomène requiert un certain temps (entre 24h et 48h), cela suggère l'implication de la néosynthèse protéique ou encore de la dégradation protéique dans l'apoptose observée suite au traitement des cellules avec le PD98059. Pour vérifier ces possibilités, nous avons traité les cellules avec un inhibiteur de synthèse protéique, la cycloheximide, ainsi qu'avec un inhibiteur de protéasome, le LLnL (Palombella *et al.*, 1994). Malheureusement, nous n'avons pu évaluer l'implication de la néosynthèse protéique dans l'apoptose induite par un traitement prolongé au PD98059 puisque l'ajout de 20µg/ml de cycloheximide aux cellules a été suffisant pour induire une fragmentation de l'ADN (fig. 32A). Cependant, l'ajout du PD98059 à ces cellules n'a pas augmenté la fragmentation déjà observée. Quant au LLnL, aucune fragmentation de l'ADN n'a été visualisée dans les cellules traitées avec cet inhibiteur de protéasome et

**Figure 32. Effet de l'inhibition du protéasome sur la fragmentation de l'ADN et sur l'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques dans les cellules MIA PaCa-2 traitées au PD98059**

**A.** 30µg d'ADN des cellules traitées 48h avec 0.001% DMSO (-), 20µM PD98059 ± 15µM LLnL ont été visualisés par coloration au bromure d'éthidium après avoir migré sur un gel d'agarose 1.5%. **B.** 60µg de protéines des lysats de cellules traitées pendant 16h, 24h ou 48h avec 0.001% DMSO, 20µM PD98059 ± 15µM LLnL ont été séparés par SDS-PAGE 12.5% et analysés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps qui reconnaissent Bcl-2(1/1000), Bcl-X<sub>L</sub> (1/1000) et Mcl-1 (1/200).

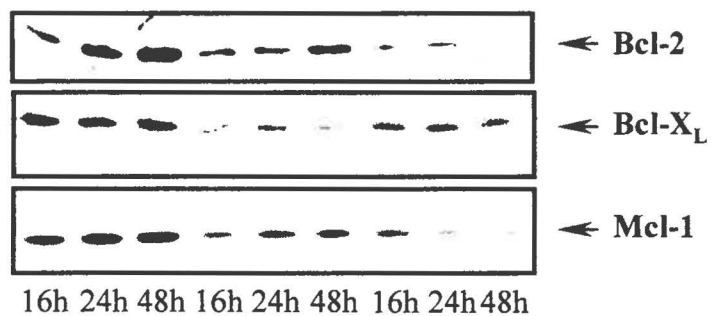
**A.**

PD98059 20 $\mu$ M:	-	+	-	+	-	+
LLnL 15 $\mu$ M:	-	-	+	+	-	-
Cycloheximide 20 $\mu$ g/mL:	-	-	-	-	+	+



**B.**

PD98059 20 $\mu$ M:	-	-	-	+	+	+	+	+	+
LLnL 15 $\mu$ M:	-	-	-	-	-	-	+	+	+



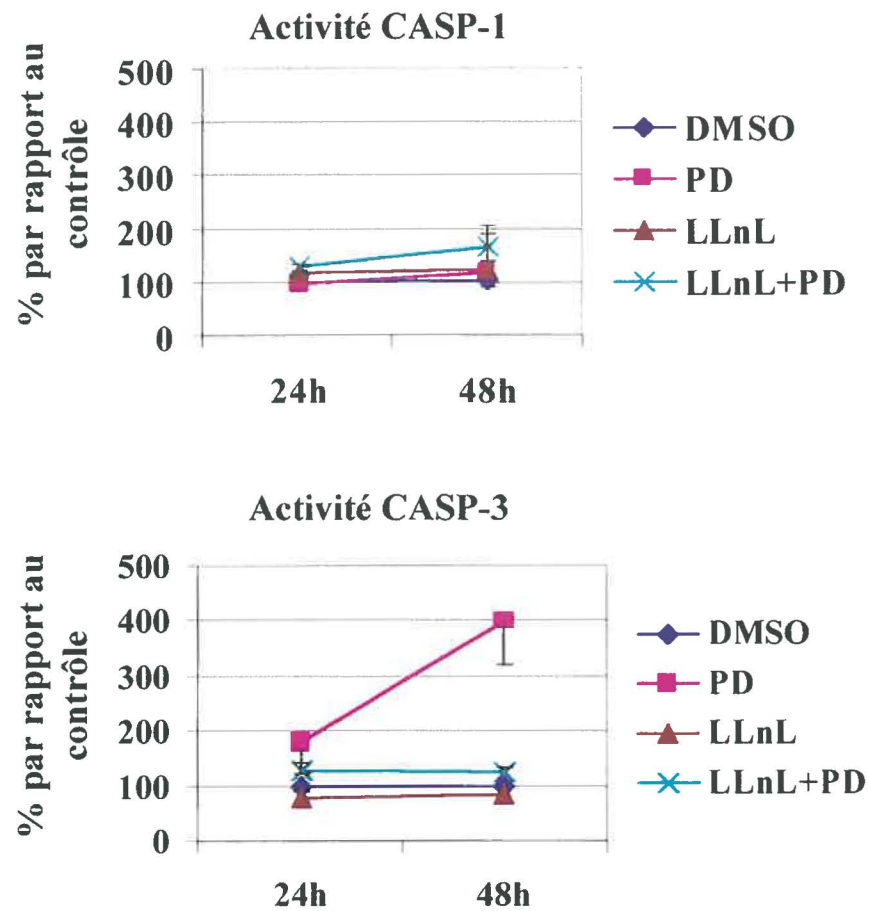
surtout, il a complètement bloqué la fragmentation de l'ADN induite par un traitement des cellules au PD98059 pendant 48h (fig. 32A).

Afin de comprendre comment un inhibiteur de protéasome pouvait protéger contre la mort cellulaire programmée suite à une inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs, nous avons évalué son effet sur l'expression des homologues anti-apoptotiques Bcl-2 ainsi que sur l'activité de la famille CASP-3. Tel que démontré à la figure 32B, l'addition du LLnL aux cellules traitées au PD98059 a eu pour effet d'accentuer la répression de l'expression des homologues Bcl-2 et Mcl-1. Cependant, l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> a été partiellement rétablie. Encore une fois, seuls les homologues ayant variés au cours du traitement avec le PD98059 ont été évalués. De plus, le protéasome semble impliqué dans la régulation de l'activité CASP-3 puisque l'addition de LLnL aux cellules a prévenu l'activation de la famille CASP-3 induite par le PD98059 (fig. 33A) sans toucher à l'activité de type CASP-1. En accord avec ce résultat, le clivage de la PARP a été partiellement bloqué par le LLnL après 48h de traitement avec le PD98059 (fig. 33B).

**Figure 33. Effet de l'inhibition du protéasome sur l'activité de la famille CASP-1 et CASP-3 et sur l'expression de PARP dans les cellules MIA PaCa-2 traitées au PD98059**

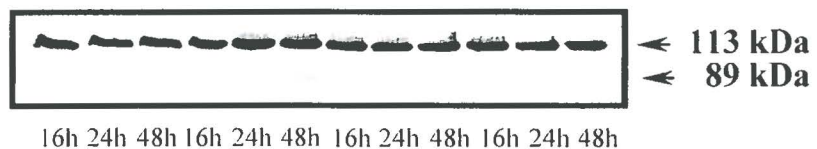
**A.** Les cellules ont été traitées pendant 24h ou 48h avec 0.001% DMSO (-) ou 20 $\mu$ M PD98059  $\pm$  15 $\mu$ M LLnL. 25 $\mu$ g de protéines ont été incubés avec 20 $\mu$ M de Ac-YVAD-AMC, un substrat de la famille CASP-1 (graphique du haut), ou de Ac-DEVD-AMC, un substrat de la famille CASP-3 (graphique du bas), et l'émission émise par le peptide fluorogénique AMC libéré suite à une activité caspase a été mesurée grâce à un spectrofluoromètre. **B.** 60 $\mu$ g de protéines des lysats de cellules traitées pendant 16h, 24h ou 48h avec 0.001% DMSO (-), 20 $\mu$ M PD98059  $\pm$  15 $\mu$ M LLnL ont été séparés par SDS-PAGE 7.5% et analysés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la PARP (1/10000).

A.



B.

PD98059 20  $\mu$ M: - - - + + + - - - + + +  
 LLnL 15  $\mu$ M: - - - - - + + + + + +



## **16. Effet de la forskoline + IBMX sur la viabilité des cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2**

Dans la première partie de mon travail, j'ai décrit comment la forskoline + IBMX arrivaient à inhiber la prolifération cellulaire : via l'inhibition des p42/p44 MAPKs et l'expression élevée de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>Kip1</sup>. Comme on peut le constater, il s'agit pratiquement des mêmes effets que ceux occasionnés par le traitement des cellules au PD98059. Nous pouvons donc nous demander si la forskoline + IBMX n'induirait pas l'apoptose dans les cellules MIA PaCa-2. Pour vérifier cela, nous avons traité les cellules avec ces agents pendant 48h, temps requis par le PD98059 pour induire une fragmentation de l'ADN. La figure 34A nous confirme que la forskoline + IBMX bloquent les cellules en phase G1 du cycle cellulaire (fig. 9B) sans les entraîner dans un programme apoptotique.

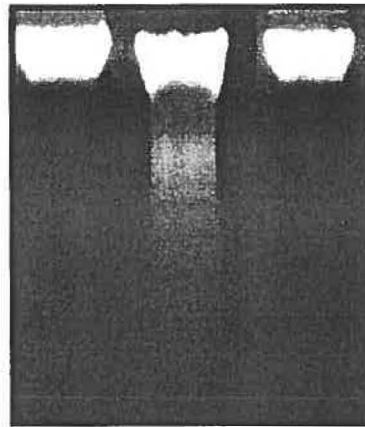
**Figure 34. Effet de la forskoline + IBMX (F + I) sur la viabilité des  
cellules MIA PaCa-2**

**A.** Les cellules ont été traitées pendant 24h ou 48h avec 0.001% DMSO (-), 20µM PD98059 ou 4µg/mL de forskoline + 1mM IBMX. 30µg de l'ADN extrait des cellules traitées ont été portés sur gel d'agarose 1.5% et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. **B.** 30µg de protéines des lysats de cellules traitées pendant 24h ou 48h avec 0.001% DMSO (-), 20µM PD98059 ou 4µg/mL de forskoline + 1mM IBMX ont été séparés par SDS-PAGE 10% et analysés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique aux p42/p44 MAPKs actives (1/500).



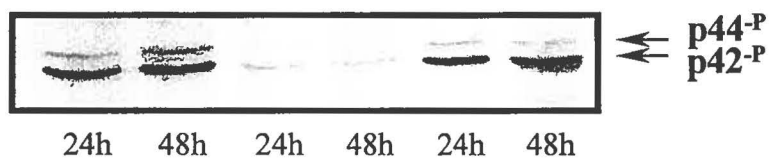
A.

PD98059 20 $\mu$ M:	-	+	-
F + I:	-	-	+



B.

PD98059 20 $\mu$ M:	-	-	+	+	-	-
F + I:	-	-	-	-	+	+



## **CHAPITRE IV**

### **DISCUSSION**

#### **1. Inhibition de la prolifération des cellules pancréatiques tumorales humaines PANC-1 et MIA PaCa-2 par l'AMPc**

En utilisant la forskoline, un activateur de l'adénylyl cyclase (Seamon et Daly, 1986), et l'IBMX, un inhibiteur de phosphodiésterases (Parsons *et al.*, 1988), nous avons démontré que le traitement des cellules PANC-1 et MIA PaCa-2 avec la combinaison de ces agents résultait en l'inhibition de la prolifération cellulaire confirmée par la méthode de croissance clonale (fig. 8). Ce blocage de la prolifération résulte d'un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire puisque le traitement des cellules PANC-1 et MIA PaCa-2 avec la forskoline + IBMX inhibe la réinitiation de la synthèse d'ADN (fig. 9) et réduit les niveaux de phosphorylation de pRb et p130 (fig. 10).

Aussi, nous avons montré que la forskoline + IBMX bloque de façon soutenue (pendant au moins 2h) l'activité des p42/p44 MAPKs observée en absence et en présence de sérum (fig. 11). Comme je l'ai décrit dans l'introduction, l'activation de ces kinases est nécessaire à la prolifération des cellules (Robinson et Cobb, 1997). Ces résultats sont en accord avec d'autres études démontrant l'effet inhibiteur de l'AMPc sur l'activité des p42/p44

MAPKs (Chen et Iyengar, 1994; Matousovic *et al.*, 1995). En effet, des travaux ont démontré que l'AMPc peut prévenir l'activation de Raf-1 par Ras (Cook et McCormick, 1993; D'Angelo *et al.*, 1997). Cela serait rendu possible grâce à l'intervention de la protéine kinase A (PKA) qui est activée par l'AMPc (Walsh *et al.*, 1968). En effet, il a été démontré que la PKA phosphorylait, *in vitro* et *in vivo*, Raf-1 (Hafner *et al.*, 1994) sur la sérine 43 située dans le domaine régulateur réduisant ainsi l'affinité de Raf-1 pour Ras (Wu *et al.*, 1993). Nos résultats semblent donc en accord avec un tel mécanisme d'action de l'AMPc dans l'inhibition des p42/p44 MAPKs, mais nécessiteraient la confirmation par le dosage des activités des activateurs en amont des p42/p44 MAPKs soit le dosage de Ras, Raf et MEK. Ce qu'on observe dans les cellules pancréatiques tumorales humaines diffère cependant des résultats obtenus dans les fibroblastes de hamster CCL39 où l'augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc décalait la cinétique d'activation des p42/p44 MAPKs sans pour autant inhiber la voie (McKenzie et Pouyssegur, 1996).

Malheureusement, cet effet de l'AMPc n'a pu être confirmé dans des cellules pancréatiques normales. Malgré le fait que les agents utilisés sont connus pour augmenter les concentrations intracellulaires d'AMPc dans les acini pancréatiques de rat (Larose *et al.*, 1989), une très légère inhibition de l'activité des p42/p44 MAPKs stimulées par la caeruleine a été observée dans les acini pré-incubés avec la forskoline + IBMX tandis qu'une stimulation de ces enzymes est survenue lors de la pré-incubation des cellules avec la sécrétine

(fig. 18). Pour expliquer en partie ces résultats, soulignons le fait que les PANC-1 et MIA PaCa-2 sont des cellules pancréatiques tumorales humaines d'origine ductale (Lieber *et al.*, 1975; Yunis *et al.*, 1977). Donc, en plus de provenir d'une autre espèce, le rat, les acini normaux diffèrent de par leur origine cellulaire. Il est possible que la régulation des événements intracellulaires induits par l'AMPc varient d'une espèce à l'autre et d'une origine cellulaire à l'autre. Quant à l'effet de la sécrétine qui accroît l'activité des p42/p44 MAPKs dans les acini non stimulés et stimulés par la caeruleïne, rappelons que la sécrétine potentialise l'effet trophique de la caeruleïne sur le pancréas exocrine de rat (Sarfati *et al.*, 1985; Solomon *et al.*, 1983). Étant donné leur rôle important dans la prolifération cellulaire, les p42/p44 MAPKs pourraient être un moyen par lequel la sécrétine potentialise l'effet de la caeruleïne sur la croissance pancréatique.

Pour réellement vérifier le rôle de l'inhibition des p42/p44 MAPKs dans l'action antimitogénique de l'AMPc, nous avons cotransfecté un mutant constitutif actif de la MEK1 avec le gène rapporteur E2F-luciférase, gène rapporteur indicatif de prolifération cellulaire. Tel que démontré à la figure 17, l'expression de ce mutant n'affecte pas l'effet inhibiteur de la forskoline + IBMX sur l'activité du gène rapporteur E2F-luciférase. Cela suggère que l'AMPc possède d'autres cibles cellulaires impliquées dans le contrôle de la prolifération, comme par exemple les protéines du cycle cellulaire.

Nous avons aussi démontré que le traitement des cellules PANC-1 et MIA PaCa-2 avec la forskoline + IBMX n'influence pas l'expression des cyclines D1 et E (fig. 12). Ceci est en opposition avec des résultats obtenus dans les fibroblastes de hamster CCL39 où l'AMPc bloquait l'augmentation de l'expression de la cycline D1 induite par les facteurs de croissance (L'Allemain *et al.*, 1997). En réalité, dans les cellules PANC-1 et MIA PaCa-2, l'expression de la cycline D1 semble élevée même en absence de sérum et semble très peu modulable. Une surexpression de la cycline D1 a déjà été observée dans des carcinomes pancréatiques humains et s'est avérée reliée à un pauvre pronostic de survie (Gansauge *et al.*, 1997). Ainsi, la surexpression de la cycline D1 représente probablement un moyen par lequel les cellules prolifèrent d'une façon anarchique. De plus, il ne faut pas oublier que les cellules PANC-1 et MIA PaCa-2, même en absence de sérum, démontrent des signes de prolifération cellulaire (fig. 9 et Freeman *et al.*, 1995). Ainsi, même si les cellules ont subi une privation en sérum pendant 48h, elles ne sont donc pas synchronisées et arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire et par conséquent, une augmentation de l'expression de la cycline D1 normalement entraînée par le sérum lors de la transition des cellules de la phase G1 vers la phase S ne peut être visualisée puisque les cellules progressent déjà dans le cycle cellulaire.

Dans ce travail, nous avons également démontré que la forskoline + IBMX 1- accentuaient l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>Kip1</sup> dans les cellules privées de sérum et 2- bloquaient la dégradation de cet

inhibiteur normalement observée suite à une stimulation mitogénique (fig. 13). Cela concorde avec des résultats antérieurs indiquant que p27<sup>Kip1</sup> jouait un rôle important dans l'inhibition de la prolifération causée par l'AMPc dans les fibroblastes (L'Allemain *et al.*, 1997) et dans les macrophages (Kato *et al.*, 1994). Nos résultats n'indiquent cependant pas si la forskoline + IBMX agissent en inhibant la dégradation (Pagano *et al.*, 1995), en augmentant la synthèse de p27<sup>Kip1</sup> (Hengst et Reed, 1996) ou encore s'ils agissent aux deux niveaux comme le fait le 8Br-AMPc (un analogue perméable de l'AMPc) dans les macrophages (Kato *et al.*, 1994).

L'activité cdk2 est aussi affectée par un traitement des cellules, privées et stimulées au sérum, à la forskoline + IBMX (fig. 15A. et 16A). Nos résultats suggèrent que l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> participe à l'inhibition de l'activité cdk2 causée par un tel traitement. En effet, la figure 16C nous indique que l'expression de p27<sup>Kip1</sup> par rapport à celle de cdk2 ne varie pas dans les lysats totaux des cellules non stimulées au sérum lors du traitement à la forskoline + IBMX. Cependant, lorsque l'on jette un coup d'œil sur la quantité de p27<sup>Kip1</sup> coimmunoprécipité avec cdk2, on constate que la forskoline + IBMX favorisent l'association de l'inhibiteur à cdk2. Dans les cellules stimulées au sérum, l'ajout de forskoline + IBMX permet d'élever le ratio p27<sup>Kip1</sup> : cdk2 à 4 : 1 dans les lysats totaux, tandis que dans les immunoprécipités cdk2, le ratio est de 2.5 : 1. Cela suggère que la majorité des protéines p27<sup>Kip1</sup> sont associées à cdk2 dans les cellules stimulées au sérum et traitées avec la forskoline + IBMX sans

toutefois exclure la possibilité que des inhibiteurs p27<sup>Kip1</sup> peuvent être liés à d'autres complexes comme celui de la cycline D/cdk4 ou encore peuvent être demeurés non-associés.

Finalement, pour confirmer le rôle clé de p27<sup>Kip1</sup> dans l'inhibition de la prolifération entraînée par la forskoline + IBMX, la figure 17 nous indique que la simple surexpression de l'inhibiteur dans nos cellules pancréatiques tumorales humaines est suffisante pour bloquer complètement les cellules en phase G1 du cycle cellulaire, alors que l'expression d'une MEK CA n'arrive pas à empêcher cet arrêt en phase G1 causée par un traitement des cellules à la forskoline + IBMX. Ces résultats suggèrent que 1- l'inhibition des p42/p44 MAPKs n'est pas nécessaire pour l'inhibition de la prolifération causée par la forskoline + IBMX et que, 2- contrairement à certaines études démontrant un rôle des p42/p44 MAPKs dans la diminution de l'expression de p27<sup>Kip1</sup> (Alessandrini *et al.*, 1997; Greulich et Erickson, 1998; Kawada *et al.*, 1997; Kerkhoff et Rapp, 1998; Rivard *et al.*, 1999), la régulation de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> par la forskoline + IBMX dans les cellules pancréatiques tumorales humaines semble, du moins en partie, indépendante des p42/p44 MAPKs.

## 2. Le TGFβ inhibe partiellement la prolifération des cellules PANC-1

Le TGFβ a préalablement été décrit comme un excellent inhibiteur de la prolifération des cellules d'origine épithéliale (Hartsough et Mulder, 1997). De

plus, ses mécanismes d'action au niveau des protéines impliquées dans le contrôle de la prolifération sont relativement bien connus. Dans les cellules épithéliales intestinales de rat IEC-6, le TGF $\beta$  inhibe la synthèse de la cycline D1 ce qui a pour conséquence de réduire la formation de complexe cycline D1-cdk4 et ainsi de diminuer l'activité de ce complexe (Ko *et al.*, 1998). Dans les cellules épithéliales de poumons de vison, le TGF $\beta$  inhibe l'expression de cdk4 supprimant l'activité du complexe cycline D-cdk4 et libérant des inhibiteurs p27<sup>Kip1</sup> qui peuvent alors bloquer l'activité de d'autres complexes cycline-cdk (Ewen *et al.*, 1993). Toujours dans ce même type cellulaire, l'augmentation de l'expression de l'inhibiteur p15<sup>INK4B</sup> suite au traitement des cellules avec le TGF $\beta$  a pour effet de déplacer p27<sup>Kip1</sup> du complexe cycline D1-cdk4/6 vers celui de la cycline E-cdk2 pour permettre l'inhibition de l'activité de ce dernier complexe (Polyak *et al.*, 1994). Dans les kératinocytes (Hannon et Beach, 1994), dans les cellules épithéliales de poumon de vison (Reynisdottir *et al.*, 1995) et dans les cellules épithéliales mammaires humaines (Sandhu *et al.*, 1997), la surexpression importante de l'inhibiteur p15<sup>INK4B</sup> amenée par le TGF $\beta$  lie cdk4/6 et bloque par le fait même la prolifération cellulaire. L'augmentation de l'expression de p21<sup>Cip1</sup> joue également un rôle dans l'inhibition de la prolifération des cellules Mv1Lu (Reynisdottir *et al.*, 1995). Finalement, dans les cellules épithéliales mammaires humaines, c'est



**l'inhibition de l'expression de la phosphatase activatrice des cdk, la cdc25A, qui médie l'effet anti-prolifératif du TGF $\beta$  (Iavarone et Massague, 1997).**

**Nos résultats démontrent que le TGF $\beta$  inhibe partiellement l'effet du sérum 1% sur la prolifération, au terme de cinq jours, des cellules pancréatiques tumorales humaines PANC-1 (fig. 8A). Au niveau de la réinitiation de la synthèse d'ADN, la cytokine n'influence pas l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine dans les cellules privées de sérum, mais réduit de près de 50% l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine normalement observée dans les cellules PANC-1 stimulées au sérum pendant 22h (fig. 9A). Quant aux protéines de la famille de pRb, pRb et p130, le TGF $\beta$  empêche l'augmentation des niveaux d'hyperphosphorylation normalement entraînée par le sérum 1% (fig. 10A).**

**Les protéines régulatrices de la prolifération affectées par le TGF $\beta$  diffèrent de celles impliquées dans l'arrêt en phase G1 médié par la forskoline + IBMX. En effet, le TGF $\beta$  n'influence pas l'activité des p42/p44 MAPKs ni le patron d'expression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> (fig. 11A et 13A). Contrairement à ce qui a déjà été observé dans les cellules mammaires (Iavarone et Massague, 1997), aucune variation dans l'expression de cdc25A n'a pu être décelée suite au traitement des cellules PANC-1 avec le TGF $\beta$ . Nos résultats n'excluent cependant pas la possibilité que l'activité de cdc25A a pu être régulée suite au traitement des cellules avec le TGF $\beta$ . En effet, très peu d'études démontrent une régulation de cdc25A autre que sa régulation via son**

expression, mais de récentes données suggèrent que l'activité de cdc25A pourrait être régulée positivement via sa phosphorylation au cours de la progression vers la phase S (Hoffman *et al.*, 1994). Plus précisément, Pim1, un oncogène codant pour une sérine/thréonine kinase a récemment été identifiée comme liant et phosphorylant cdc25A *in vitro* et *in vivo* et ayant pour effet d'augmenter l'activité phosphatase de cdc25A (Mochizuki *et al.*, 1999). Les effets majeurs de la cytokine semble reposer sur la surexpression de l'inhibiteur p15<sup>INK4B</sup> dans les cellules stimulées avec le sérum et la surexpression de p21<sup>Cip1</sup> dans les cellules à la fois privées de sérum et stimulées par le sérum pendant 16h (fig. 13A). Ces résultats ne sont pas en total désaccord avec ce qu'on obtient en réinitiation de la synthèse d'ADN où le TGFβ inhibe que partiellement l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine des cellules stimulées au sérum. On peut imaginer un système où la surexpression de p21<sup>Cip1</sup> observée dans les cellules privées de sérum n'est pas tout-à-fait suffisante pour bloquer l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine dans ces cellules. Cependant, lorsque p15<sup>INK4B</sup> se met de la partie (dans les cellules stimulées avec le sérum) les deux inhibiteurs réussissent à réduire l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine. Ce mécanisme ressemblerait alors à ce qu'on observe dans les cellules épithéliales de vison où l'augmentation de l'inhibiteur p15<sup>INK4B</sup> suite au traitement des cellules avec le TGFβ déplace p27<sup>Kip1</sup> vers le complexe cycline E-cdk2 pour permettre l'inhibition de ce dernier complexe. Ainsi, dans notre système, on pourrait croire que l'augmentation d'expression de p21<sup>Cip1</sup> bloque partiellement

complexes cycline D-cdk4/6 et cycline E-cdk2, mais l'augmentation de l'expression de p15<sup>INK4B</sup> concentre l'inhibiteur p21<sup>Cip1</sup> vers le complexe cycline E-cdk2 qui peut alors être inhibé et c'est ainsi que les inhibiteurs réussissent à réduire l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine. De plus, on ne peut éliminer complètement le rôle de p27<sup>Kip1</sup> dans cette inhibition. Comme c'était le cas dans les cellules épithéliales de poumon de vison, sans augmenter l'expression de p27<sup>Kip1</sup>, le TGFβ amplifiait l'expression de p15<sup>INK4B</sup> qui inhibait cdk4/6 et déplaçait p27<sup>Kip1</sup> vers le complexe cycline E-cdk2 pour inhiber son activité (Polyak *et al.*, 1994). Dans notre travail, il n'est pas exclu que p15<sup>INK4B</sup> et/ou p21<sup>Cip1</sup> déplacent p27<sup>Kip1</sup> vers la cycline E-cdk2 pour réduire son activité. Pour vérifier cette hypothèse, il s'agirait d'immunoprécipiter cdk4 et cdk2 et de regarder quel(s) inhibiteur(s) leur sont liés. Je mentionne également cdk4 puisque lorsque l'on examine l'activité cdk2 dans les cellules stimulées au sérum et traitées au TGFβ (fig. 15B), on n'observe qu'une légère inhibition après 16h de traitement. Cela peut signifier plusieurs choses : 1- l'inhibition de l'activité cdk2 observée après 16h suffit à bloquer de 50% l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine après 22h de stimulation au sérum; 2- comme les niveaux de phosphorylation de pRb sont comparables à ceux des cellules contrôles (non stimulées) après 16h de traitement des cellules avec le TGFβ + sérum et que pRb est l'unique substrat du complexe cycline D-cdk4 (Sherr et Roberts, 1995), l'activité de ce dernier complexe est peut-être davantage inhibée que celle de la

cycline E-cdk2 ou encore 3- l'effet du TGF $\beta$  sur la prolifération des PANC-1 serait une question de cinétique dans le sens où cette cytokine n'aurait pour effet que d'allonger la durée de la phase G1 du cycle cellulaire. Pour répondre à ces questions, une cinétique plus détaillée de l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine en fonction du temps ainsi que le dosage de l'activité cycline D/cdk4 seraient nécessaires.

Il est à noter que le TGF $\beta$ , dans notre système, n'induit aucun événement apoptotique malgré le fait que cette cytokine a déjà été décrite pour avoir un rôle dans la régulation de l'apoptose (Fan *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1993; Hsing *et al.*, 1996; Lin et Chou, 1995; Oberhammer *et al.*, 1992; Sanchez *et al.*, 1996).

Une question demeure : pourquoi l'effet du TGF $\beta$  n'est-il que partiel alors qu'il a été décrit comme un puissant régulateur de la croissance pancréatique? Tout d'abord, je tiens à préciser que l'absence d'effet du TGF $\beta$  chez les MIA PaCa-2 pourrait s'expliquer par une absence d'expression du récepteur de type II du TGF $\beta$  dans cette lignée cellulaire, phénomène déjà observé par deux groupes de chercheurs (Freeman *et al.*, 1995; Baldwin *et al.*, 1996). Pour les cellules PANC-1, malgré que cela ne réponde pas totalement à la question, je tiens à mettre en lumière une observation intéressante. Comme je l'ai déjà mentionné plus tôt, les cellules pancréatiques tumorales humaines semblent exprimer de hauts niveaux de cycline D1 qui ne varient pas suite à

une stimulation au sérum 1% ou suite à un traitement au TGF $\beta$ . Or, si on transfecte la cycline D1 dans des cellules intestinales épithéliales de rat (RIE) normalement sensibles à l'effet anti-prolifératif du TGF $\beta$ , on diminue considérablement la proportion de cellules en phase S suite au traitement de ces cellules transfectées avec le TGF $\beta$  (Ko *et al.*, 1998). D'une façon plus convaincante, Okamoto *et al.* (1994) ont rapporté que la lignée cellulaire non-tumorale HET-1A (des cellules épithéliales provenant de l'œsophage) transfectée avec la cycline D1 1- exprimait une quantité importante de cette protéine, 2- devenait résistante au TGF $\beta$  et 3- montrait une diminution de l'expression du récepteur de type II du TGF $\beta$  ce qui expliquerait la diminution de l'effet de la cytokine sur la prolifération cellulaire. Comme la cycline D1 est souvent surexprimée dans les tumeurs humaines, les auteurs suggèrent qu'une dérégulation de l'expression du gène de la cycline D1 peut moduler négativement la signalisation du TGF $\beta$ .

Notre étude sur l'effet du TGF $\beta$  sur la prolifération cellulaire s'est limitée aux p42/p44 MAPKs et aux protéines du cycle cellulaire. Dans des travaux futurs, il serait également intéressant de clarifier le rôle des Smads, des médiateurs de la signalisation du TGF $\beta$  (Massagué, 1998), sur l'inhibition de la prolifération amenée par la cytokine. En effet, de récentes études ont démontré un rôle de Smad3 (Datto *et al.*, 1999) et de Smad6 (Kleeff *et al.*, 1999) dans le contrôle de la réponse anti-proliférative du TGF $\beta$ .

### **3. Les p42/p44 MAPKs médient un signal de survie chez les cellules pancréatiques tumorales humaines**

Comme il a été clairement démontré dans plusieurs types cellulaires (Brondello *et al.*, 1995; Pagès *et al.*, 1993; Robinson et Cobb, 1997), nos résultats indiquent que les p42/p44 MAPKs jouent un rôle essentiel dans la progression du cycle cellulaire chez les cellules pancréatiques tumorales humaines. Le blocage de cette voie diminue dramatiquement l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine dans les cellules non stimulées et stimulées avec le sérum (fig. 19B). Cet arrêt en phase G1 est probablement médié par l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> dont l'expression est augmentée suite au traitement des cellules avec le PD98059 (fig. 19C), l'inhibiteur spécifique des MEKs (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995).

Si on prolonge l'inhibition des p42/p44 MAPKs pendant une période de 48h, les cellules présentent les caractéristiques de cellules apoptotiques soit une fragmentation de leur ADN (fig. 20A). Cet effet ne semble cependant pas répandu chez toutes les lignées cellulaires pancréatiques tumorales humaines puisque les cellules PANC-1, à l'opposé des MIA PaCa-2 et BxPc-3, ne sont pas affectées par un traitement prolongé au PD98059 (20µM) (fig. 20). Cette induction de la mort cellulaire programmée nécessite 1- un certain niveau d'inhibition des p42/p44 MAPKs démontré par la réponse dose-dépendante du

PD98059 versus la dégradation de l'ADN (fig. 21A et B) et 2- l'activité des p42/p44 MAPKs doit être réduite pendant plus de 24h pour affecter la survie des cellules (fig. 21C). Cela suggère qu'après 24h, tous les mécanismes conduisant à l'apoptose ne sont pas enclenchés et que le phénomène est encore réversible.

La réduction d'activité des p42/p44 MAPKs s'accompagne d'une diminution importante de l'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et Mcl-1, sans affecter significativement les membres pro-apoptotiques Bax et Bak, mais augmentant Bad de 50% au bout de 48h. Ceci est en accord avec des résultats obtenus chez les cellules hématopoïétiques. L'utilisation d'une forme oncogénique inducible de Ras (Ras<sup>Val12</sup>) résulte en une augmentation de l'expression de Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> sans modulation de l'expression de Bax (Kinoshita *et al.*, 1995) et cet effet semble accompli par les voies de Raf/MAPK et de la p70<sup>s6k</sup> (Kinoshita *et al.*, 1997). Un autre groupe a montré que Mcl-1 était régulé lui aussi par les p42/p44 MAPKs dans les cellules myéloblastiques ML-1 (Townsend *et al.*, 1998). Ainsi, comme on sait que le ratio entre membres anti- et pro-apoptotiques joue un rôle important dans la régulation de leur fonction (Farrow et Brown, 1996), on constate rapidement que dans notre système ce ratio est en faveur d'un cheminement des cellules vers une mort apoptotique.

La deuxième catégorie de protéines effectrices de l'apoptose, les caspases, sont aussi impliquées dans la mort cellulaire observée suite à

**l'inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs : 1- l'activité de la famille CASP-3 est augmentée dans les cellules traitées au PD98059 pendant 48h (fig. 25); 2- ceci concorde avec le clivage de la PARP, un substrat spécifique des caspases-3 et -7 *in vivo* (Lazebnik *et al.*, 1994; Salvesen et Dixit, 1997) (fig. 26); 3- et finalement, l'utilisation d'inhibiteurs de la famille CASP-1 et CASP-3 bloque la réponse apoptotique causée par le PD98059 (fig. 27). Si on porte attention à la figure 27, on constate que l'utilisation de l'inhibiteur de la famille CASP-1, le z-VAD-fmk, à une concentration de 10µM ou 50µM prévient partiellement ou complètement respectivement la fragmentation de l'ADN causée par le traitement des cellules pendant 48h avec le PD98059. Cependant, la combinaison des inhibiteurs de type CASP-1 et de type CASP-3, aux concentrations qui bloquaient partiellement la fragmentation de l'ADN, a eu un effet inhibiteur complet. Pourtant, l'activité CASP-1 n'est pas détectée dans les cellules traitées pendant 24h et 48h au PD98059 (fig. 25). Une explication à ce phénomène repose sur le fait que le z-VAD-fmk a déjà été décrit pour inhiber l'activité de la famille CASP-3 lorsqu'ajouté à de fortes concentrations perdant ainsi de sa spécificité (Vercammen *et al.*, 1998). De cette façon, la combinaison des deux inhibiteurs peut contribuer à l'inhibition massive de la famille CASP-3 résultant au blocage absolu de la fragmentation de l'ADN normalement observée après 48h d'inhibition des p42/p44 MAPKs. Pour appuyer cette possibilité, il faudrait traiter les cellules au PD98059 + z-VAD-fmk et doser l'activité de la famille CASP-3 après 24h et 48h de traitement. On**



ne peut cependant exclure complètement l'implication de d'autres caspases puisque l'utilisation du z-DEVD-fmk, même à une concentration de 100 $\mu$ M, n'arrive jamais à bloquer entièrement la fragmentation. Ceci peut laisser insinuer que le z-VAD-fmk pourrait peut-être inhiber une autre caspase que celle de type CASP-1 ou CASP-3 dans notre modèle. Une seconde explication pourrait être suggérée pour expliquer pourquoi on observe un effet protecteur du z-VAD-fmk sur la fragmentation de l'ADN sans pour autant détecter de modulation de l'activité de la famille CASP-1 dans les cellules traitées pendant 24h ou 48h avec le PD98059. En effet, de plus en plus d'évidences sont en faveur d'un modèle où une caspase initiatrice est d'abord activée (activité courte et non soutenue) qui est subséquemment responsable de l'activation de caspases effectrices qui elles ont une activité soutenue (Salvesen et Dixit, 1997; Thornberry et Lazebnik, 1998). Ainsi, il se pourrait que dans notre modèle, l'inhibition des p42/p44 MAPKs conduit à l'activation précoce de la famille CASP-1 qui agirait comme caspase(s) initiatrice(s) et qui, à son tour, activerait la famille CASP-3 dont l'activité est détectée après 24h et 48h de traitement des cellules MIA PaCa-2 au PD98059. Pour vérifier cette hypothèse, un dosage de l'activité de la famille CASP-1 en des temps inférieurs à 24h (après le traitement au PD98059) serait requis. Si aucune activité de la famille CASP-1 ne peut, en aucun temps, être décelée, il faudrait probablement s'en remettre à la première hypothèse.

Récemment, il avait été suggéré que le débalancement des différentes cascades MAPKs, soit la diminution des p42/p44 MAPKs versus une augmentation de la p38 MAPK ou/et JNKs (Berra *et al.*, 1998; Canman et Kastan, 1996; Xia *et al.*, 1995), entraînait les cellules vers un programme apoptotique. La particularité du présent travail repose sur le fait que l'inhibition des p42/p44 MAPKs survient en absence de toute modulation de l'activité de la p38 MAPK et des JNKs (fig. 22) suggérant que la voie p42/p44 MAPKs médie vraiment un signal de survie dans les cellules pancréatiques tumorales.

L'inhibiteur de la p38 MAPK, le SB203580, nous a été utile pour appuyer le rôle exclusif des p42/p44 MAPKs dans la régulation des événements apoptotiques associés à l'inhibition de ces kinases. En effet, dans notre modèle, le SB203580 stimule les p42/p44 MAPKs de façon soutenue, phénomène déjà décrit dans d'autres systèmes (Hall-Jackson *et al.*, 1999; Kalmes *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1999). De plus, l'addition du SB203580 à des cellules traitées avec le PD98059 ramène l'activité des p42/p44 MAPKs au niveau de celle retrouvée dans les cellules contrôles. On remarque que le traitement des cellules avec le SB203580 1- bloque la fragmentation de l'ADN causée par le PD98059; 2- augmente l'expression des homologues Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et Mcl-1; 3- ramène au niveau contrôle l'expression de ces mêmes homologues lorsque les cellules sont traitées simultanément avec le SB203580 et le PD98059; 4- inhibe l'activité de type CASP-3 et 5- empêche le clivage de

la PARP causé par le traitement des cellules au PD98059. Il faut mentionner que le traitement des cellules MIA PaCa-2 au SB203580 n'a aucun effet sur la survie de ces cellules. On a cependant déjà rapporté que l'inhibition de la cascade p38 MAPK par le SB202190 induisait l'apoptose dans les cellules lymphocytaires Jurkat (Nemoto *et al.*, 1998).

Ces résultats sont en faveur d'un rôle des p42/p44 MAPKs dans la régulation de l'expression des homologues anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et Mcl-1 ainsi que dans la régulation de l'activité de type CASP-3. Le retour de l'expression de ces homologues à des niveaux analogues à ceux des cellules contrôles et le blocage partiel de l'activité de type CASP-3 stimulée par le PD98059 pourrait suggérer que les homologues ne se situent pas en amont des caspases dans la signalisation menant à l'apoptose comme il a déjà été rapporté (Kharbanda *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997; Susin *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). Il semblerait que les deux phénomènes soient indépendants tout en étant sous le contrôle des p42/p44 MAPKs. Une récente étude laisse entrevoir une telle possibilité. Un modèle a déjà été proposé et suggérait que les homologues anti-apoptotiques Bcl-2 liaient Apaf-1 prévenant ainsi l'activation de la procaspase-9 (Thornberry et Lazebnik, 1998). Cependant, il a récemment été démontré qu'aucun des homologues Bcl-2 testés (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-w, A1, Boo et même les membres pro-apoptotique Bax et Bim) ne liait *in vivo* Apaf-1 (Moriishi *et al.*, 1999). Ainsi, les homologues anti-apoptotiques Bcl-2 ne semblent pas protéger les cellules contre l'apoptose en séquestrant Apaf-1

dans ce modèle cellulaire. Dans notre système, malgré cette possibilité, il n'est pas exclue que les homologues Bcl-2 soient en amont de l'activation des caspases. En effet, comme nous avons évalué l'expression des homologues Bcl-2 qui variaient au cours du traitement au PD98059, on ne peut exclure la possibilité que l'expression d'homologues autres que ceux analysés varie lors du traitement avec le PD98059 en combinaison avec le SB203580.

L'expression stable d'un mutant hyperactif de la MEK1 atténue considérablement la fragmentation de l'ADN (fig. 31B) et retarde le clivage de la PARP (fig. 31C) causée par le traitement des cellules au PD98059 (20 $\mu$ M) confirmant indubitablement le rôle des p42/p44 MAPKs dans la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines.

La période de 48h requise pour observer une fragmentation de l'ADN suite à l'inhibition des p42/p44 MAPKs laissait présager une implication de la néosynthèse protéique ou encore de la dégradation protéique dans le cheminement des cellules vers l'apoptose dans notre système. L'utilisation du LLnL nous a permis de découvrir que l'inhibition du protéasome 1- bloquait complètement la fragmentation de l'ADN induite par le PD98059; 2- allégeait la diminution d'expression de Bcl-X<sub>L</sub> observée après le traitement des cellules au PD98059; 3- bloquait complètement l'activation de la caspase-3 (ou famille de la caspase-3) et 4- réduisait abondamment le clivage de PARP (fig. 32 et 33). Ces résultats laissaient présager encore une fois que la régulation des homologues Bcl-2 et des caspases pourraient être deux processus indépendants

sous le contrôle des p42/p44 MAPKs, que le protéasome est impliqué dans la stabilité de Bcl-X<sub>L</sub> et que la famille de la CASP-3 se situe en aval d'une dégradation protéique comme déjà rapporté (Grimm *et al.*, 1996; Sadoul *et al.*, 1996). Cependant, nos résultats suggèrent une régulation transcriptionnelle de l'expression de Bcl-2 et Mcl-1 par la cascade p42/p44 MAPKs puisque l'inhibition du protéasome par le LLnL ne restaure pas et même accentue la diminution d'expression de ces homologues induite par le PD98059 (fig. 32B). Ces résultats diffèrent de récentes études sur le sujet. En effet, il a été démontré que la phosphorylation de Bcl-2 par les p42/p44 MAPKs prévenait la fragmentation de l'ADN induite par l'angiotensine II dans les cellules PC12W (Horiuchi *et al.*, 1997). Tout dernièrement, un groupe allemand a montré que la phosphorylation de Bcl-2 par les p42/p44 MAPKs stabilisait la protéine ce qui l'empêchait d'être dégradée dans le protéasome et lui conférait ainsi une résistance contre l'effet apoptotique du TNF $\alpha$  dans les cellules endothéliales (Dimmeler *et al.*, 1999). Cependant, pour appuyer une possible régulation transcriptionnelle de Bcl-2 et Mcl-1 par les p42/p44 MAPKs, il a récemment été démontré qu'un segment de 162 paires de bases du gène humain de Mcl-1 était régulé par les p42/p44 MAPKs via l'activité transcriptionnelle de SRF/ELK-1 (Townsend *et al.*, 1999).

À prime abord, on ne pouvait exclure la possible implication de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> dans l'induction de l'apoptose observée suite au traitement des cellules pendant 48h avec le PD98059. En effet, dans le cas présent,

l'inhibition des p42/p44 MAPKs par le PD98059 résulte en une augmentation de l'expression de p27<sup>Kip1</sup> appuyant un contrôle de l'expression de cet inhibiteur par les p42/p44 MAPKs (Alessandrini *et al.*, 1997; Greulich et Erickson, 1998; Kawada *et al.*, 1997; Kerkhoff et Rapp, 1998; Rivard *et al.*, 1999). Sachant qu'une surexpression de p27<sup>Kip1</sup> a déjà été associée à la fragmentation de l'ADN et au clivage de la PARP (Katayose *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997), l'hypothèse demeurerait plausible. Cependant, le traitement des cellules à la forskoline + IBMX, qui élèvent l'expression de p27<sup>Kip1</sup> de manière comparable à celle observée suite au traitement des cellules avec le PD98059 (fig. 13B et 19) sans inhiber l'activité p42/p44 MAPKs après 24h et 48h de traitement (fig. 34B), ne provoque aucune mort cellulaire prouvée par l'absence de fragmentation de l'ADN dans ces cellules (fig. 34A). Ce résultat élimine donc la possible implication de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>Kip1</sup> dans le processus de mort cellulaire programmée dans notre modèle et confirme qu'une inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs est requise pour initier un programme apoptotique.

En résumé, il semblerait que l'activité des p42/p44 MAPKs maintenue dans les cellules pancréatiques tumorales humaines, en plus de son rôle dans la prolifération cellulaire, serait indispensable au maintien de la viabilité cellulaire. L'abrogation de cette cascade MAPKs chemine les cellules vers la mort cellulaire programmée en influençant l'expression (homologues anti-apoptotiques Bcl-2) et l'activité (famille CASP-3) des protéines effectrices de

l'apoptose. Les cellules peuvent toutefois être rescapées de la mort par la stimulation de voies de signalisation activées par le sérum (fig. 20 et 26). Ultérieurement, il serait intéressant de déterminer les voies de signalisation impliquées dans l'effet protecteur du sérum chez les cellules MIA PaCa-2 traitées au PD98059. L'activation de la cascade PI3K/Akt et de NFKappaB représente des cibles de choix vu leurs rôles bien connus dans la survie cellulaire de d'autres types cellulaires (Beg et Baltimore, 1996; Franke et Cantley, 1997a; Franke *et al.*, 1997b; Jarpe *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996)

#### 4. Conclusions et perspectives

Malgré la caractéristique des cellules tumorales à proliférer d'une façon anarchique, il a été possible d'inhiber la prolifération des cellules pancréatiques tumorales humaines PANC-1 et MIA PaCa-2. En effet, il semble que les voies essentielles de régulation de la prolifération des cellules normales jouent également un rôle important dans la prolifération désordonnée des cellules tumorales. Ainsi, l'utilisation d'agents connus pour augmenter les concentrations intracellulaires d'AMPc, la forskoline + IBMX, a eu pour effet de bloquer les cellules en phase G1 du cycle cellulaire suite à l'action de ces agents sur l'activité des p42/p44 MAPKs et l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>Kip1</sup>. Pour clarifier davantage l'importance de chacune de

ces voies dans l'inhibition de la prolifération causée par ces agents, il serait intéressant de vérifier l'effet d'un antisens de p27<sup>Kip1</sup> sur l'effet anti-prolifératif de la forskoline + IBMX. Si une seule des voies, inhibition de l'activité des p42/p44 MAPKs ou surexpression de p27<sup>Kip1</sup>, est suffisante pour médier l'arrêt en phase G1 suite au traitement des cellules à la forskoline + IBMX, alors on pourrait prédire que l'expression d'un antisens de p27<sup>Kip1</sup> n'empêchera pas l'inhibition de prolifération causée par la forskoline + IBMX tout comme l'expression d'un mutant constitutif actif de la MEK1 n'a pas bloqué la diminution de l'activité E2F-luciférase suite au traitement des cellules à la forskoline + IBMX.

De plus, tout comme dans les cellules normales, la cascade p42/p44 MAPKs est indispensable à la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Non seulement l'inhibition des p42/p44 MAPKs conduit à l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, mais leur inhibition prolongée dirige les cellules vers la mort cellulaire programmée. Cela suggère que les mutations de Ki-Ras fréquemment observées dans les cellules pancréatiques tumorales (Friess *et al.*, 1996) et qui ont pour effet de stimuler continuellement la cascade p42/p44 MAPKs jouent un rôle important dans le maintien de la viabilité des cellules pancréatiques tumorales humaines.

Les travaux présentés dans ce rapport montrent que les p42/p44 MAPKs régularisent à la fois l'expression des homologues anti-apoptotiques Bcl-2,



**Mcl-1 et Bcl-X<sub>L</sub> et l'activité des caspases de la famille CASP-3. Nos résultats avec le LLnL, un inhibiteur de protéasome, nous laissent 1- entrevoir une régulation de la stabilité de Bcl-X<sub>L</sub> via le protéasome et 2- suggèrent une régulation transcriptionnelle de Bcl-2 et Mcl-1 par les p42/p44 MAPKs. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'observer, par northern blot, la régulation de l'expression des ARNm de Bcl-2 et Mcl-1 (et Bcl-X<sub>L</sub>) suite au traitement des cellules avec le PD98059.**

Tel que discuté précédemment, il pourrait être possible que les homologues Bcl-2 ne soient pas en amont des caspases tout en étant tous deux sous le contrôle des p42/p44 MAPKs. Pour vérifier cette hypothèse, il serait captivant de transfecter Bcl-2, Mcl-1 et/ou Bcl-X<sub>L</sub>, traiter les cellules au PD98059 et vérifier ce qu'advient de l'activité des caspases de la famille CASP-3. Si les homologues Bcl-2 et les caspases sont situés dans deux voies différentes, la surexpression des homologues anti-apoptotiques Bcl-2 ne devrait pas affecter l'activation des caspases de la famille CASP-3 amenée par le traitement des cellules au PD98059. Dans cette même expérience, nous pourrions également évaluer si l'unique diminution d'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques ou la simple activité de la famille CASP-3 amenée par le traitement des cellules au PD98059 est suffisante ou si le double effet est nécessaire pour diriger les cellules vers un programme apoptotique. Il ne faut cependant pas oublier que l'expression de tous les homologues Bcl-2

n'a pas été analysée. Ainsi, il se pourrait par exemple que le SB203580, qui est à la base un inhibiteur de la p38 MAPK, pourrait augmenter l'expression d'un pro-apoptotique, en plus d'augmenter l'expression des anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-X<sub>L</sub>. La présence de ce pro-apoptotique pourrait expliquer pourquoi le SB203580 ne prévient que partiellement l'activation de la famille CASP-3. De plus, l'activité résiduelle de ce type de caspases ne serait pas suffisant pour induire la fragmentation de l'ADN. Dans le cas du LLnL, il se pourrait que le traitement des cellules au PD98059 entraîne la dégradation dans le protéasome d'un (ou de) autre(s) homologue(s) anti-apoptotique(s) autre(s) que ceux testés. La prévention de la dégradation de cet homologue pourrait être suffisant pour prévenir complètement l'activation de la famille CASP-3 et la fragmentation de l'ADN induite par le PD98059.

Finalement, plusieurs autres études pourraient être effectuées à l'aide du clone cellulaire exprimant un mutant constitutif actif de la MEK1. Nous avons démontré que l'expression de ce mutant prévenait l'apoptose causée par le traitement des cellules au PD98059. Il serait original de vérifier si l'expression de ce mutant constitutif actif de la MEK confère aux cellules une certaine résistance envers d'autres stimuli pro-apoptotiques tels que le TNF $\alpha$ , le FasL, les rayons UV et les chocs thermiques. Comme le mutant constitutif actif de la MEK active la cascade p42/p44 MAPKs (Brunet *et al.*, 1994), nous pourrions examiner si les signaux de survie desservis par les p42/p44 MAPKs sont

suffisants pour protéger les cellules contre des attaques normalement néfastes à la survie cellulaire.

En conclusion, ce travail aura permis de mieux comprendre les voies de signalisation qui régularisent la prolifération et la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines. Cette meilleure compréhension sera utile dans la recherche de cibles cellulaires destinées à inhiber la prolifération anarchique de ces cellules pancréatiques tumorales. De plus, elle permettra éventuellement d'améliorer le sort des victimes atteintes du cancer du pancréas qui n'ont que 8% de chance de survie deux ans après avoir été diagnostiquées...

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à remercier tout spécialement mon directeur de recherche initial, le Dr Jean Morisset pour avoir cru en moi malgré une première année difficile. Je remercie conjointement mes directeurs de travaux, les Drs Jean Morisset et Nathalie Rivard, pour leurs encouragements et pour m'avoir transmis leur motivation, leur goût du dépassement et leur passion me permettant ainsi de réaliser ces travaux de maîtrise qui sont le fruit d'une seule année de travail ardu. Je les remercie également de m'avoir donné la chance de participer à des congrès scientifiques malgré mon grade de maîtrise; cela a eu pour conséquence d'intensifier mon goût pour la recherche scientifique.

Je tiens à remercier les Drs Gaétan Guillemette et Pierre H. Vachon pour avoir pris le temps de lire et évaluer ce mémoire.

Je tiens également à remercier le Dr J.C. Reed pour nous avoir permis d'utiliser ses anticorps contre certains homologues Bcl-2 et le Dr J. Pouysségur pour nous avoir fourni les cDNA codant pour la MEK.

Finalement, des remerciements tout particuliers à mes collègues de travail, Judith Bourassa, Claude Deschênes, Jean Lainé et Anne Vézina, pour leur support moral et scientifique. J'ajoute à ceux-ci tous mes autres copains du département avec lesquels j'ai eu de bonnes discussions scientifiques et surtout avec lesquels j'ai partagé mes petites péripéties qui m'ont valu la réputation que l'on connaît...

## **BIBLIOGRAPHIE**

Adams, J.M., et Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family; arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-1326.

Atfi, A., Buisine, M., Mazars, A., et Gespach, C. (1997) Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-beta through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signalling pathway. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24731-24934.

Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., et Pestell, R.G. (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23589-23597.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et Watson, J.D. (1994) Molecular biology of the cell. Éditions Garland Publishing Inc., New York, 1294pp.

Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., et Barrett, J.C. (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13742-13747.

Alessandrini, A., Chiaur, D.S., et Pagano, M. (1997) Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia*, **11**, 342-345.

Alessi, D.R., Smythe, C., et Keyse, S.M. (1993) The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene*, **8**, 2015-2020.

Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., et Saltiel, A.R. (1995) PD98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27489-27494.

Alessi, D.R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S.M., et Cohen, P. (1995) Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a

protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr. Biol.*, **5**, 283-295.

Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K., et Sturgill, T.W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*, **343**, 651-653.

Ashkenazi, A., et Dixit, V.M. (1998) Death receptors : signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.

Baldwin, R.L., et Korc, M. (1993) Growth inhibition of human pancreatic carcinoma cells by transforming growth factor beta-1. *Growth factors*, **8**, 23-34.

Baldwin, R.L., Friess, H., Yokoyama, M., Lopez, M.E., Kobrin, M.S., Büchler, M.W., et Korc, M. (1996) Attenuated ALK5 receptor expression in human pancreatic cancer : correlation with resistance to growth inhibition. *Int. J. Cancer*, **67**, 283-288.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.-J., Broger, C., Loetscher, H., et Lesslauer, W. (1993) Crystal structure of the soluble human 55kd TNF receptor-human TNF $\beta$  complex : implication for TNF receptor activation. *Cell*, **73**, 431-445.

Bardwell, L., Cook, J.G., Chang, E.C., Cairns, B.R., et Thorner, J. (1996) Signalling in the yeast pheromone response pathway : specific and high-affinity interaction of the mitogen-activated protein (MAP) kinases Kss1 and Fus3 with the upstream MAP kinase kinase Ste7. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3637-3650.

Barrowman, J.A., et Mayston, P.D. (1974) The trophic influence of cholecystokinin on the rat pancreas. *J. Physiol.*, **238**, 73-75.

Bartsch, D., Hahn, S.A., Danichevski, K.D., Ramaswamy, A., Bastian, D., Galehdari, H., Barth, P., Schmiegell, W., Simon, B., et Rothmund, M. (1999) Mutations of DPC4/Smad4 gene in neuroendocrine pancreatic tumors. *Oncogene*, **18**, 2367-2371.

Beg, A.A., et Baltimore, D. (1996) An essential role for NF-kB in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science*, **274**, 782-784.

Bensaid, M., Tahiri-Jouti, N., Cambillau, C., Viguerie, N., Colas, B., Vidal, C., Tauber, J.P., Esteve, J.P., Susini, C., et Vaysse, N. (1992) Basic fibroblast

growth factor induces proliferation of a rat pancreatic cancer cell line. Inhibition by somatostatin. *Int. J. Cancer*, **50**, 796-799.

Berra, E., Diaz-Meco, M.T., et Moscat, J. (1998) The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-Kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10792-10797.

Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases : proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5889-5892.

Blume-Jensen P., Janknecht R., et Hunter T. (1998) The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.*, **8**, 779-782.

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., et Wallach, D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, **85**, 803-815.

Börsch-Haubold, A.G., Pasquet, S., et Watson, S.P. (1998) Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB203580 and PD98059. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28766-28772.

Bottinger, E.P., Jakubczak, J.L., Roberts, I.S.D., Mumy, M., Hemmati, P., Bagnall, K., Merlino, G., et Wakefield, L.M. (1997) Expression of a dominant-negative mutant TGF- $\beta$  type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF- $\beta$  in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *EMBO J.*, **16**, 2621-2633.

Bosch, E., Cherwinski, H., Peterson, D., et McMahon, M. (1997) Mutations of critical amino acids affect the biological and biochemical properties of oncogenic A-Raf and Raf-1. *Oncogene*, **15**, 1021-1033.

Brady, H.J.M., Salomons, G.S., Bobeldijk, R.C., et Berns, A.J.M. (1996a) T cells from bax  $\alpha$  transgenic mice show accelerated apoptosis in response to stimuli but do not show restored DNA-damage-induced cell death in the absence of p53. *EMBO J.*, **15**, 1221-1230.

Brady, H.J.M., Gil-Gomez, G., Kirberg, J., et Berns, A.J. (1996b) Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J.*, **15**, 6991-7001.

Brondello, J.M., McKenzie, F.R., Sun, H., Tonks, N.K., et Pouyssegur, J. (1995) Constitutive MAP kinase phosphatase (MKP-1) expression blocks G1

specific gene transcription and S-phase entry in fibroblasts. *Oncogene*, **10**, 1895-1904.

Brunet, A., Pagès, G., et Pouyssegur, J. (1994) Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene*, **9**, 3379-3387.

Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., et Pouyssegur, J. (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.*, **18**, 664-674.

Buscail, L., Saint-Laurent, N., Chastre, E., Vaillant, J.C., Gespach, C., Cappella, G., Kalthoff, H., Lluís, F., Vaysse, N., et Susini, C. (1996) Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer. *Cancer Res.*, **56**, 1823-1827.

Canman, C.E., et Kastan, M.B. (1996) Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature*, **384**, 213-214.

Cardone, M.H., Salvesen, G.S., Widmann, C., Johnson, G., et Frish, S.M. (1997) The regulation of anoikis : MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*, **90**, 315-323.

Chan, F.K.M., Zhang, J., Chen, L., Shapiro, D.N., et Winoto, A. (1995) Identification of human/mouse p19, a novel cdk4/cdk6 inhibitor with homology to p16<sup>INK4</sup>. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2682-2688.

Chen, C.Y., et Faller, D.V. (1996) Phosphorylation of Bcl-2 protein and association with p21Ras in Ras-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2376-2379.

Chen, J., et Iyengar, R. (1994) Suppression of Ras-induced transformation of NIH 3T3 cells by activated G alpha s. *Science*, **263**, 1278-1281.

Chen, R.H., Abate, C., et Blenis, J. (1993) Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90kDa ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10952-10956.

Chen, R.H., et Chang, T.Y. (1997) Involvement of caspase family proteases in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *Cell Growth Differ.*, **8**, 821-827.



Chen, T.H., Sarnecki, C., et Blenis, J. (1992) Nuclear localization et regulation of ERK- and RSK-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 915-927.

Chinnaiyyan, A.M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G.G., et Dixit, V.M. (1996) Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 4573-4576.

Choi, K.S., Lim, I.K., Brady, J.N., et Kim, S.-J. (1998) ICE-like protease (caspase) is involved in transforming growth factor  $\beta$ 1-mediated apoptosis in FaO rat hepatoma cell line. *Hepatology*, **27**, 415-421.

Choi, K.S., Eom, Y.W., Kang, Y., Ha, M.J., Rhee, H., Yonn, J.-W., et Kim, S.-J. (1999) Cdc2 and cdk2 kinase activated by transforming growth factor- $\beta$ 1 trigger apoptosis through the phosphorylation of retinoblastoma protein in FaO hapatoma cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 31775-31783.

Connell-Crowley, L., Harper, J.W., et Goodrich, D.W. (1997) CyclinD1/cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 287-301.

Cook, S.J., et McCormick, F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*, **262**, 1069-1072.

Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. et Marshall, C.J. (1994) Activation of the MAP kinase kinase is both necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, **77**, 841-852.

Cristobal Aliaga, J., Deschênes, C., Beaulieu, J.-F., Calvo, E.L., et Rivard, N. (1999) Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am. J. Physiol.*, **277**, sous presse.

D'angelo, G., Lee, H., et Weiner, R.I. (1997) cAMP-dependent protein kinase inhibits the mitogenic action of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in capillary endothelial cells by blocking Raf activation. *J. Cell. Biochem.*, **67**, 353-366.

Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.

Datto, M.B., Frederick, J.P., Pan, L., Borton, A.J., Zhuang, Y., et Wang, X.-F. (1999) Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor  $\beta$ -mediated signal transduction. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2495-2504.

Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., et Dedhar, S. (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11211-11216.

Delesque, N., Buscail, L., Esteve, J.P., Saint-Laurent, N., Muller, C., Weckbecker, G., Bruns, C., Vaysse, N., et Susini, C. (1997) Sst2 somatostatin receptor expression reverses tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, **57**, 956-962.

del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R., et Nunez G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, **278**, 687-689.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., et Leder, P. (1995) Mice lacking p21<sup>CIP1/WAF1</sup> undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, **82**, 675-684.

Dérjard, B., B., Hibi, M., Wu, I.-H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., et Davis, R.J. (1994) JNK1 : a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.

Dhanasekaran, N., et Premkumar Reddy, E. (1998) Signalling by dual specificity kinase. *Oncogene*, **17**, 1447-1455.

Diaz-Meco, M.T., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M.M., Berra, E., Hay, R.T., Sturgill, T.W., et Moscat, J. (1994) Zeta PKC induces phosphorylation and inactivation of I kappa B-alpha in vitro. *EMBO J.*, **13**, 2842-2848.

DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., Karin, M. (1997) A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-KappaB. *Nature*, **388**, 548-554.

Dimmeler, S., Breischopf, K., Haendeler, J., et Zeiher, A.M. (1999) Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation : a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J. Exp. Med.*, **189**, 1815-1822.

Dowd, S., Sneddon, A.A., et Keyse, S.M. (1998) Isolation of the human genes encoding the pyst1 and pyst2 phosphatases : characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *J. Cell Sci.*, **111**, 3389-3399.

Duan, H., et Dixit, V.M. (1997) RAIDD, a novel death adaptor molecule. *Nature*, **385**, 86-89.

Duan, R.-D., et Williams, J.A. (1994) Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol.*, **267**, G401-G408.

Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J., et Saltiel, A.R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7686-7689.

El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, E., Kinzler, K.W., et Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.

Elsässer, H.-P., Adler, G., et Kern, H.F. (1993) Replication and regeneration of the pancreas. Dans *The pancreas : biology, pathobiology and disease*. Édité par Vay Liang W. Go, et al., Raven Press, New York, pp.75-86.

Ewen, M.E., Sluss, H.K., Whitehouse, L.L. et Livingston, D.M. (1993) TGF beta inhibition of cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell*, **74**, 1009-1020.

Faivre, S. (1998) Mécanismes moléculaires de régulation de l'apoptose. *Bull. Cancer*, **85**, 809-812.

Fan, G., Ma, X., Kren, B.T., et Steer, C.J. (1996) The retinoblastoma gene product inhibits TGF-beta1 induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human HuH-7 hepatoma cells. *Oncogene*, **12**, 1909-1919.

Farrow, S.N. et Brown, R. (1996) New membres of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr. Opin. Genes. Dev.*, **6**, 45-49.

Fiorucci, S., Bufalari, A., Distrutti, E., Bufalari, A., Lanfranccone, L., Servoli, A., Sarpi, L., Frederici, B., Bartoli, A., Morelli, A. et Moggi, L. (1998) Bombesin-induced pancreatic regeneration in pigs is mediated by

**p46Shc/p52Shc and p42/p44 mitogen-activated protein kinase upregulation. *Scand. J. Gastroenterol.*, **33**, 1310-1320.**

**Firpo, E.J., Koff, A., Solomon, M.J., et Roberts, J.M. (1994) Inactivation of a cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell. Biol.*, **14**, 4889-4901.**

**Fisher, R.P., et Morgan, D.O. (1994) A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, **78**, 713-724.**

**Franke, T.F., et Cantley, L.C. (1997a) Apoptosis. A Bad kinase makes good. *Cell*, **390**, 116-117.**

**Franke, T.F., Kaplan, D.R., et Cantley, L.C. (1997b) PI3K : downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, **88**, 435-437.**

**Freeman, J.W., Mattingly, C.A., et Strodel, W.E. (1995) Increased tumorigenicity in the human pancreatic cell line MIA PaCa-2 is associated with an aberrant regulation of an IGF-1 autocrine loop and lack of expression of the TGF-beta type RII receptor. *J. Cell. Physiol.*, **165**, 155-163.**

**Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., et Saklatvala, J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, **78**, 1039-1049.**

**Friess, H., Berberat, P., Schilling, M., Kunz, J., Korc, M., et Büchler, M.W. (1996) Pancreatic cancer : the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors. *J. Mol. Med.*, **74**, 35-42.**

**Friess, H., Kleeff, J., Isenmann, R., Malfertheiner, P., et Buchler, M.W. (1998) Adaptation of the human pancreas to inhibition of luminal proteolytic activity. *Gastroenterology*, **115**, 388-396.**

**Frisch, S.M., Vuori, K., Kelaita, D., et Sicks, S. (1996) A role for jun-N-terminal kinase in anoikis; suppression by bcl-2 and crmA. *J. Cell Biol.*, **135**, 1377-1382.**

**Fukuda, K., Kojiro, M., et Chiu, J.F. (Induction of apoptosis by transforming growth factor-beta-1 in the rat hepatoma cell line McA-RH7777 : a possible association with tissue transglutaminase expression. *Hepatology*, **18**, 945-953.**

**Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., et Nishida, E. (1996) Cytoplasmic localization of MAP kinase kinase directed by its N-terminal, leucine-rich amino**

acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J. Biol. Chem.*, **271**, 20024-20028.

Fukuda, M., Gotoh, Y., et Nishida, E. (1997) Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase : its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.*, **16**, 1901-1908.

Gajewski, T.F., et Thompson, C.B. (1996) Apoptosis meets signal transduction : elimination of a BAD influence. *Cell*, **87**, 589-592.

Gansauge, S., Gansauge, F., Ramadani, M., Stobbe, H., Rau, B., Harada, N., et Beger, H.G. (1997) Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Res.*, **57**, 1634-1637.

Gardner, A.M., et Johnson, G.L. (1996) Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 1456-14566.

Geng, Y., Eaton, E.N., Picon, M., Roberts, J.M., Lundberg, A.S., Gifford, A., Sardet, C., et Weinberg, R.A. (1996) Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*, **12**, 1173-1180.

Gil-Gomez, G., Berns, A., et Brady, H.J.M. (1998) A link between cell cycle and cell eath : Bax and Bcl-2 modulate cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J.*, **17**, 7209-7218.

Gille, H., Sharrocks, A.D. et Shaw, P. (1992) Phosphorylation of p62<sup>TCF</sup> by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature*, **358**, 414-417.

Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H., et Shaw, P.E. (1995) ERK phosphorylation potentiates ELK-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.*, **14**, 951-962.

Gillespie, J., Poston, G.J., Schachter, M., et Guillou, P.J. (1992) Human pancreatic cancer cell lines do not express receptors for somatostatin. *Br. J. Cancer*, **66**, 483-487.

Githens, S. (1993) Differentiation and development of the pancreas in animals. Dans *The pancreas : biology, pathobiology and disease*. Édité par Vay Liang W. Go, et al., Raven Press, New York, pp.21-56.

Gold, E.B. (1995) Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg. Clin. North Amer.*, **75**, 819.

Gonzalez, F.A., Seth, A., Raden, D.L., Bowman, D.S., Fay, F.S., et Davis, R.J. (1993) Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J. Cell Biol.*, **122**, 1089-1101.

Gopalbhai, K., et Meloche, S. (1998) Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins. *J. Cell. Physiol.*, **174**, 35-47.

Grana, X., Garriga, J., et Mayol, X. (1998) Role of the retinoblastoma protein family, pRb, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*, **17**, 3365-3383.

Grenn, D.R., et Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.

Greulich, H., et Erikson, R.L. (1998) An analysis of Mek1 signaling in cell proliferation and transformation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13280-13288.

Grimm, L.M., Golberg, A.L., Poirier, G.G., Schwartz, L.M., et Osborne, B.A. (1996) Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.*, **15**, 3835-3844.

Groom, L.A., Sneddon, A.A., Alessi, D.R., Dowd, S., et Keyse, S.M. (1996) Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J.*, **15**, 3621-3632.

Gruss, H.J., et Dower S.K. (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily : involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*, **85**, 3378-3404.

Guan, K., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M.A., Wu, X., O'keefe, C.L., Matera, A.G., et Xiong, Y. (1994) Growth suppression by p18, a p16<sup>INK4/MTS1</sup> and p14<sup>INK4/MTS2</sup> - related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes & Dev.*, **8**, 2939-2952.

Guan, K.L., et Butch, E. (1995) Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH2, which selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7197-7203.

Gupta, K., Kshirsagar, S., Li, W., Gui, L., Ramakrishnan, S., Gupta, P., Law, P.Y., et Hebbel, R.P. (1999) VEGF prevents apoptosis of human microvascular

endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp. Cell Res.*, **247**, 495-504.

Gutkind, J.S. (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors : from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, **17**, 1331-1342.

Hafner, S., Adler, H.S., Mischak, H., Janosch, P., Heidecker, G., Wolfman, A., Pippig, S., Lohse, M., Ueffing, M., et Kolch, W. (1994) Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6696-6703.

Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T.M.S., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., et Kern, S.E. (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, **271**, 350-353.

Haldar, S., Jean, N., et Croce, C.M. (1995) Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4507-4511.

Hall-Jackson, C.A., Goedert, M., Hedge, P., Cohen, P. (1999) Effect of SB203580 on the activity of c-Raf in vitro and in vivo. *Oncogene*, **18**, 2047-2054.

Ham, J., Babij, C., Whitfield, J., Pfarr, C.M., Lallemand, D., Yaniv, M., et Rubin, L.L. (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron*, **14**, 927-939.

Hamilton, M., et Wolfman, A. (1998) Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene*, **16**, 1417-1428.

Han, J., Lee, J.-D., Bibbs, L., et Ulevitch, R.J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265**, 808-811.

Hannon, G.J., et Beach, D. (1994) p15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of cell cycle arrest mediated by TGF- $\beta$ . *Nature*, **371**, 257-261.

Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., et Peters, G. (1996) Regulation of p16<sup>CDKN2</sup> expression and its implication for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 859-867.

Harsough, M.T., et Mulder, K.M. (1997) Transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial cells. *Pharmacol. Ther.*, **75**, 21-41.

Haystead, T.A., Dent, P., Wu, J., Haystead, C.M., et Sturgill, T.W. (1992) Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett.*, **306**, 17-22.

Hengst, L., et Reed, S.I. (1996) Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*, **271**, 1861-1864.

Herrera, R.E., Sah, V.P. Williams, B.O., Makela, T.P., Weinberg, R.A., et Jacks, T. (1996) Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2402-2407.

Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J., Ashmun, R.A., et Sherr, C.J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2672-2681.

Hiromura, K., Pippin, J.W., Fero, M.L., Roberts, J.M., et Shankland, S.J. (1999) Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *J. Clin. Invest.*, **103**, 597-604.

Hirotsu, M., Zhang, Y., Fujita, N., Maito, M., et Tsuruo, T. (1999) NH<sub>2</sub>-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20415-20420.

Hoffman, I., Draetta, G., et Karsenti, E. (1994) Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J.*, **13**, 4302-4310.

Horiuchi, M., Hayashida, W., Kambe, T., Yamada, T., et D'Zau, V.J. (1997) Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **272**, 19022-19026.

Hosoi, H., Dilling, M.B., Shokata, T., Liu, L.N., Shu, L., Ashmun, R.A., Germain, G.S., Abraham, R.T., Houghton, P.J. (1999) Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.*, **59**, 886-894.

Hsing, A.Y., Kadomatsu, K., Bonham, M.J., et Danielpour, D. (1996) Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor- $\alpha$  in nontumorigenic rat prostatic epithelial cell lines. *Cancer Res.*, **56**, 5146-5149.



Hsu, H., Xiong, J., et Goeddel, D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-Kappa B activation. *Cell*, **81**, 495-504.

Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., et Goeddel, D. (1996a) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, **4**, 387-396.

Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., et Goeddel, D.V. (1996b) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, **84**, 299-308.

Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., et Nunez, G. (1998) Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4386-4391.

Hunter, T. (1997) Oncoprotein networks. *Cell*, **88**, 333-346.

Iavarone, A., et Massagué, J. (1997) Repression of the CDK activator Cdc25A and cell cycle arrest by cytokine TGF- $\beta$  in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature*, **387**, 417-422.

Ishibashi, T., Bottaro, D.P., Michieli, P., Kelley, C.A., et Aaronson, S.A. (1994) A novel dual specificity phosphatase induced by serum stimulation and heat shock. *J. Biol. Chem.*, **269**, 29867-29902.

Janknecht, R., Ernst, W.H., Pingoud, V., et Nordheim, A. (1993) Activation of TCF Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J.*, **12**, 5097-5104.

Janknecht, R., Ernst, W.H., et Nordheim, A. (1995) SAP1a is a nuclear target of signalling cascades involving ERKs. *Oncogene*, **10**, 1209-1216.

Jarpe, M.B., Widmann, C., Knall, C., Schlesinger, T.K., Gibson, S., Yujiri, T., Fanger, G.R., Gelfand, E.W., et Johnson, G.L. (1998) Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction : checkpoints and stop signs along the road to death. *Oncogene*, **17**, 1475-1482.

Jiang, H., Lin, J., Su, Z., Collart, F.R., Huberman, E., et Fisher, P.B. (1994) Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene*, **9**, 3397-3407.

Kahan, C., Seuwen, K., Meloche, S., et Pouyssegur, J. (1992) Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **267**, 13369-13375.

Kalmes, A., Deou, J., Clowes, A.W., Daum, G. (1999) Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated preotein kinase inhibitor SB203580. *FEBS Lett.*, **444**, 71-74.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., et Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, **51**, 6304-6311.

Katayose, Y., Kim, M., Rakkar, A.N., Li, Z., Cowan, K.H., et Seth, P. (1997) Promoting apoptosis : a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res.*, **57**, 5441-5445.

Kato, J.-Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massagué, J., et Sherr, C.J. (1994) Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27<sup>Kip1</sup>) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell*, **79**, 487-496.

Kawada, M., Yamagoe, S., Murakami, Y., Suzuki, K., Mizuno, S., et Uehara, Y. (1997) Induction of p27kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signalling pathway. *Oncogene*, **15**, 629-637.

Kelekar, A., et Thompson, C.B. (1998) Bcl-2-family proteins : the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.*, **8**, 324-330.

Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordans, J., Bellacosa, A., Tschlis, P.N., et Hay, N. (1997) The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.*, **11**, 701-713.

Kerkhoff, E., et Rapp, U.R. (1998) Cell cyle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene*, **17**, 1457-1462.

Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z.-M., Saxena, S., Weichselbaum, R. *et al.* (1997) Role for Bcl-X<sub>L</sub> as an inhibitor of cytosolic cytochrome c accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6939-6942.

Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., et Cobb, M.H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, **93**, 605-615.

King, A.G., Ozanne, B.W., Smythe, C., et Ashworth, A. (1995) Isolation and characterization of a uniquely regulated threonine, tyrosine phosphatase (TYP1) which inactivates ERK2 and p54JNK. *Oncogene*, **11**, 2553-2563.

Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K., et Miyajima, A. (1995) Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene*, **10**, 2207-2212.

Kinoshita, T., Shirouzu, M., Kamiya, A., Hashimoto, K., Yokoyama, S., et Miyajima, A. (1997) Raf/MAPK and rapamycin/sensitive pathways mediate the anti-apoptotic function of p21Ras in IL-3-dependent hematopoietic cells. *Oncogene*, **15**, 619-627.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., et Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins from a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.*, **14**, 5579-5588.

Kleeff, J., et Korc, M. (1998) Up-regulation of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  receptors by TGF- $\beta$ 1 in COLO-357 cells. *J. Biol.Chem.*, **273**, 7495-7500.

Kleeff, J., Maruyama, H., Friess, H., Büchler, M.W., Falb, D., et Korc, M. (1999) Smad6 supresses TGF- $\beta$ -induced growth inhibition in COLO-357 pancreatic cancer cells and is overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**, 268-273.

Kluck, R.M., Bossy Wetzel, E., Grenn, D.R., Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1136.

Ko, T.C., Yu, W., Sakai, T., Sheng, H., Shao, J., Beauchamp, R.D., et Thompson, E.A. (1998) TGF- $\beta$ 1 effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. *Oncogene*, **16**, 3445-3454.

Kolch, W., Heidecker, G., Lloyd, P., et Rapp, U.R. (1991) Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature*, **350**, 426-428.

Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., et Rapp, U.R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, **364**, 249-252.

Krajewski, S., Bodrug, S., Gascoyne, R., Berean, K., Krajewska, M., et Reed, J.C. (1994a) Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am. J. Pathol.*, **145**, 515-525.

Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H.G., et Reed, J.C. (1994b) Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am. J. Pathol.*, **145**, 1323-1336.

Krude, T., Jackman, M., Pines, J., et Lasky, R.A. (1997) Cyclin/cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell*, **88**, 109-119.

Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., et Kastan, M.B. (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7491-7495.

Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., et Woodgett, J.R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, **369**, 156-160.

Ladha, M.H., Lee, K.Y., Upton, T.M., Reed, M.F., et Ewen, M.E. (1998) Regulation of exit from quiescence by p27 and cyclin D1-CDK4. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6605-6615.

Lafon, C., Mathieu, C., Guerrin, M., Pierre, O., Vidal, S., et Valette, A. (1996) Transforming growth factor beta 1-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells : protection by the antioxydant N-acetylcysteine and Bcl-2. *Cell Growth Differ.*, **7**, 1095-1104.

L'Allemain, G., Lavoie, J.N., Rivard, N., Baldin, V., et Pouyssegur, J. (1997) Cyclin D1 expression is a major target of the cAMP-induced inhibition of cell cycle entry in fibroblasts. *Oncogene*, **14**, 1981-1990.

Larose, L., Leclerc, L., Asselin, J., Ruel, S., et Morisset, J. (1989) Muscarinic cholinergic induced secretin subsensitivity in rat isolated pancreatic acini. Effects on amylase release, cyclic adenosine monophosphate and inositol phosphate formation. *Pancreas*, **4**, 71-78.

Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R., et Pouyssegur, J. (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44 MAPK and negatively by the p38/HOG MAPK pathway. *J. Biol. Chem.*, **271**, 20608-20616.

Lazebnik, Y.A., Kaufman, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., et Earnshaw, W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**, 346-347.

Leblond, C.P., et Walker, B.E. (1956) Renewal of cell populations. *Physiol. Rev.*, **36**, 255.

Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.-J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L., et Young, P.R. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, **372**, 739-746.

Lee, M.H., Reynisdottir, et Massagué, J. (1995) Cloning of p57<sup>Kip2</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.*, **9**, 639-649.

Lee, M.S., Gu, D., Feng, L., Curriden, S., Arnush, M., Krah, T., Gurushanthaiah, D., Wilson, C., Loskutoff, D.L., Fox, H., et al. (1995) Accumulation of extracellular matrix and developmental dysregulation in the pancreas by transgenic production of transforming growth factor-beta 1. *Am. J. Pathol.*, **147**, 42-52.

Lee, P.C., et Lebenthal, E. (1993) Prenatal and postnatal development of the human exocrine pancreas. Dans *The pancreas : biology, pathobiology and disease*. Édité par Vay Liang W. Go, et al., Raven Press, New York, pp.57-71.

Le Gallic, L., Sgouras, D., Beal, G. Jr., et Mavrothalassitis, G. (1999) Transcriptional repressor ERF is a Ras/Mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4121-4133.

Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., Claret, F.-X., Grenn, D.R., et Karin, M. (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 751-763.

Lenormand, P., Sardet, G., Pagès, G., L'Allemain, G., Brunet, A., et Pouyssegur, J. (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk et p44 mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **122**, 1079-1089.

Lenormand, P., Brondello, J.-M., Brunet, A., et Pouyssegur, J. (1998) Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires

both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J. Cell Biol.*, **142**, 625-633.

Leone, G., DeGregori, J., Jakoi, L., Cook, J.G., et Nevins, J.R. (1999) Collaborative role of E2F transcriptional activity and G1 cyclin dependent kinase activity in the induction of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6626-6631.

Levenberg, S., Yarden, A., Kam, Z., et Geiger, B. (1999) p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene*, **18**, 869-876.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., et Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.

Li, P., Nijhawan, D., Dubihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., et Wang, X. (1997) Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.

Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A., et Xiong, Y. (1994) Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene*, **9**, 2261-2268.

Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., et Todaro, G. (1975) Establishment of a continuous tumor-cell line (Panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer*, **15**, 741-747.

Lieberman, M.D., Paty, P., Li, X.K., Naama, H., Evoy, D., et Daly, J.M. (1996) Elevation of intracellular cyclic adenosine monophosphate inhibits the epidermal growth factor signal transduction pathway and cellular growth in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Surgery*, **120**, 354-359.

Liebow, C., Reilly, C., Serrano, M., et Schally, A.V. (1989) Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2003-2007.

Lin, J.K., et Chou, C.K. (1992) In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.*, **52**, 385-388.

Lin, L., Wartmann, M., Lin, A., Knopf, J.L., Seth, A., et Davis, R.J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*, **72**, 269-278.

- Linette, G.P., Li, Y., Roth, K., et Korsmeyer, S.J. (1996) Cross-talk between cell death and cell cycle progression : Bcl-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **18**, 9545-9552.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., et Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts : requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, **86**, 147-157.
- Liu, X.H., Yao, S., Kirschenbaum, A., et Levine, A.C. (1998) NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res.*, **58**, 4245-4249.
- Liu, Z.-G., Hsu, H., Goeddel, D., et Karin, M. (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions : JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kB activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-576.
- Lockshin, R.A., et Williams, C.M. (1964) Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths. *J. Insect. Physiol.*, **10**, 643.
- Logsdon, C.D., Keyes, L., et Beauchamps, R.D. (1992) Transforming growth factor-beta (TGF-beta 1) inhibits pancreatic acinar cell growth. *Am. J. Physiol.*, **262**, G364-G368.
- Logsdon, C.D., et Williams, J.A. (1986) Pancreatic acinar cells in monolayer culture : direct trophic effects of caerulein in vitro. *Am. J. Physiol.*, **250**, G440-G447.
- Longnecker, D.S., Lilja, H.S., French, J.I., Kuhlmann, E., et Noll, W. (1979) Transplantation of azarine-induced carcinomas of pancreas in rats. *Cancer Lett.*, **7**, 197-202.
- Loo, D.T., et Rillema, J.R. (1998) Measurement of cell death. *Methods Cell Biol.*, **57**, 251-264.
- Lora, M., Denault, J.B., Leduc, R., de Brum-Fernandes, A.J. (1998) Systematic pharmacological approach to the characterization of NSAIDs. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **59**, 55-62.
- Lundberg, A.S., et Weinberg, R.A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 753-761.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., et Wang, X. (1998) Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptor. *Cell*, **94**, 481-490.

Mainz, D.L., Black, O., et Webster, P.D. (1973) Hormonal control of pancreatic growth. *J. Clin. Invest.*, **52**, 2300-2304.

Marais, R., Wynne, J., et Treisman, R. (1993) The SRF accessory protein ELK-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, **73**, 381-393.

Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., et Marshall, C.J. (1995) Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.*, **14**, 3136-3145.

Martell, K.J., Seasholtz, A.F., Kwak, S.P., Clemens, K.K., et Dixon, J.E. (1995) hVH-5 : a protein tyrosine phosphatase abundant in brain that inactivates mitogen-activated protein kinase. *J. Neurochem.*, **65**, 1823-1833.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., et Kroemer, G. (1998) The permeability transition pore complex : a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.*, **187**, 1261-1271.

Massagué, J. (1998) TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 753-791.

Matousovic, K., Grande, J.P., Chini, C.C., Chini, E.N., et Dousa, T.P. (1995) Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes type-III and type-IV suppress mitogenesis of rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.*, **96**, 401-410.

Matsuoka, S., Edwards, M., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Bladini, A., Harper, J.W., et Elledge, S.J. (1995) p57<sup>Kip2</sup>, a structurally distinct member of the p21<sup>Cip1</sup> cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.*, **9**, 650-662.

Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., et Kato, J.Y. (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2066-2076.

Mazel, S., Burtrum, D., et Petrie, H.T. (1996) Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression : a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J. Exp. Med.*, **183**, 2219-2226.



McKenzie, F.R., et Pouyssegur, J. (1996) cAMP-mediated growth inhibition in fibroblasts is not mediated via mitogen-activated protein (MAP) kinase (ERK) inhibition. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13476-13783.

Meloche, S., Seuwen, K., Pagès, G., et Pouyssegur, J. (1992) Biphasic and synergistic activation of p44 (ERK1) by growth factors : correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 845-854.

Menke, A., Yamaguchi, H., Gress, T.M., et Adler, G. (1997) Extracellular matrix is reduced by inhibition of transforming growth factor beta1 in pancreatitis in the rat. *Gastroenterology*, **113**, 295-303.

Menke, A., Geerling, I., Giehl, K., Vogelmann, R., Reinshagen, M., et Adler, G. (1999) Transforming growth factor- $\beta$ -induced upregulation of transforming growth factor- $\beta$  expression in pancreatic regeneration. *Biochim. Biophys. Acta*, **1149**, 178-185.

Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., *et al.* (1997) IKK-1 and IKK2 : cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-KappaB activation. *Science*, **278**, 860-866.

Meyerson, M. et Harlow, E. (1994) Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclinD partner. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2077-2086.

Margolin, N., Raybuck, S.A., Wilson, K.P., Chen, W., Fox, T., Gu Y., Livingston D.J. (1997) Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme and related caspases. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7223-7228.

Mochizuki, T., Kitanaka, C., Noguchi, K., Muramatsu, T., Asai, A., et Kuchino, Y. (1999) Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and cdc25A phosphatase. Implication for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **274**, 18659-18666.

Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases : engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 261-291.

Moriishi, K., Huang, D.C., Cory, S., et Adams, J.M. (1999) Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9683-9688.

Morisset, J., Genik, P., Lord, A., et Solomon, T.E. (1982) Effects of chronic administration of somatostatin on rat exocrine pancreas. *Regul. Pept.*, **4**, 49-58.

Morisset, J. (1984) Somatostatin : a potential antigrowth factor for the exocrine pancreas. *Regul. Pept.*, **10**, 11-22.

Morisset, J., Levenez, F., Corring, T., Benrezzak, O., Pelletier, G., et Calvo, E. (1996) Pig pancreatic acinar cells possess predominantly the CCK-B receptor subtype. *Am. J. Physiol.*, **271**, E397-E402.

Morse, L., Chen, D., Franklin, D., Xiong, Y., et Chen-Kian, S. (1997) Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18 (INK4c) and IL-6. *Immunity*, **6**, 47-56.

Muda, M., Boschert, U., Smith, A., Antonsson, B., Gillieron, C., Chabert, C., Camps, M., Martinou, I., Ashworth, A., et Arkinstall, S. (1997) Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *J. Biol. Chem.*, **272**, 5141-5151.

Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S., et Lin, A. (1998) Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38 beta mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 16415-16420.

Nevins, J.R. (1992) E2F : a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*, **258**, 424-429.

Nguyen, H., Gitig, D.M., et Koff, A. (1999) Cell-free degradation of p27kip1, a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on cdk2 activity and the proteasome. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1190-1201.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.-T., Yu, V.L., et Miller, D.K. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, **376**, 37-43.

Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M., et Smith, J.R. (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.*, **211**

Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Wartmann, M., Raden, D.L., et Davis, R.J. (1991) Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 169. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15266-15276.

Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W.M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M.H., Massagué, J., Crabtree, G., et Roberts, J. M. (1994) Interleukin-2-mediated elimination of p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature*, **372**, 570-573.

Oberhammer, F.A., Pavelka, M., Shrama, S., Tiefenbacher, R., Purchio, A.F., Bursh, W., et Schulte-Hermann, R. (1992) Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5408-5412.

Ogata, M., Oh-hora, M., Kosugi, A., et Hamaoka, T. (1999) Inactivation of mitogen-activated protein kinases by a mammalian tyrosine-specific phosphatase, PTPBR7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 52-56.

Okamoto, A., Jiang, W., Kim, S.J., Spillaire, E.A., Stoner, G.D., Weinstein, I.B., et Harris, C.C. (1994) Overexpression of human cyclin D1 reduces the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor and growth inhibition by TGF-beta 1 in an immortalized human esophageal epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11576-11580.

Okazaki, K., et Sagata, N. (1995) The mos/mapk kinase pathway stabilizes c-fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3. *EMBO J.*, **14**, 5048-5059.

Ohtsubo, M., et Roberts, J.M. (1993) Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science*, **259**, 1908-1912.

Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M., et Pagano, M. (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2612-2624.

Opie, E.L. (1932) Cytology of the pancreas. In *Special cytology*. Cowdry, E.D. (ed) Paul B. Hoeber Inc., New York, 2<sup>nd</sup> edition, p.375.

O'Reilly, L.A., Huang, D.C., et Strasser, A. (1996) The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologs influence control of cell cycle entry. *EMBO J.*, **15**, 6979-6990.

Orth, K., O'Rourke, K., Salvesen, G.S., et Dixit, V.M. (1996) Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 20977-20980.

Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Berr-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F., et Rolfe, M. (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, **269**, 682-685.

Pagès, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.-C., Meloche, S., et Pouyssegur, P. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42<sup>mapk</sup> and p44<sup>mapk</sup> are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8319-8323.

Pagès, G., Brunet, A., L'Allemain, G., et Pouyssegur, J. (1994) Constitutive mutant and putative regulatory serine phosphorylation site of mammalian MAP kinase kinase (MEK1). *EMBO J.*, **13**, 3003-3010.

Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., et Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, **75**, 773-785.

Pan, G., O'Rourke, K., Dixit, V.M. (1998) Caspase-9, Bcl-XL and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5841-5845.

Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, **246**, 603-608.

Parrizas, M., Saltiel, A.R., et LeRoith, D. (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.*, **272**, 154-161.

Parsons, W.J., Ramkumar, V., et Stiles, G.L. (1988) Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, Gi. *Mol. Pharmacol.*, **34**, 37-41.

Peikin, S.R., Rothman, A.J., Batzri, S., et Gardner, J.D. (1978) Kinetics of amylase release by dispersed acini from guinea pig pancreas. *Am. J. Physiol.*, **235**, E743-E749.

Pelletier, N., Boudreau, F., Yu, S.J., Zannoni, S., Boulanger, V., et Asselin, C. (1998) Activation of haptoglobin gene expression by cAMP involves CCAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.*, **439**, 275-280.

Polyak, K., Kato, J., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massagué, J., Roberts, J.M., et Koff, A. (1994) p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.*, **8**, 9-22.

Price, M.A., Rogers, A.E., et Treisman, R. (1995) Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, Sap-1a and Sap-2 (ERP/NET). *EMBO J.*, **14**, 2589-2601.

Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Shurtleff, S.A., Kato, J.-Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M.F., et Sherr, C.J. (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.*, **7**, 1559-1571.

Radulovic, S., Comaru-Schally, A.M., Milovanovic, S., et Schally, A.V. (1993) Somatostatin analogue RC-160 and LH-RH antagonist SB-75 inhibit growth of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer xenografts in nude mice. *Pancreas*, **8**, 88-97.

Rao, L., et White, E. (1997) Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators : making a connection. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 52-58.

Ray, L.B., et Sturgill, T.W. (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1502-1506.

Reed, J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.*, **124**, 1-6.

Reed, J.C. (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, **17**, 3225-3236.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., et Reed, S.I. (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1669-1679.

Resnitzky, D., et Reed, S.I. (1995) Different roles for cyclins D and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3463-3469.

Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., et Massague, J. (1995) Kip/Cip and Ink4 cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- $\beta$ . *Genes Dev.*, **9**, 1831-1845.

Reynisdottir, I., et Massague, J. (1997) The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.*, **11**, 492-503.

Reznikoff, C.A., Yeager, T.R., Belair, C.D., Savelieva, E., Puthenveetil, J.A., et Stadler, W.M. (1996) Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res.*, **56**, 2886-2890.

Rivard, N., Guan, D., Maouyo, D., Grondin, G., Bérubé, F.L., et Morisset, J. (1991) Endogenous cholecystokinin release responsible for pancreatic growth observed after pancreatic juice diversion. *Endocrinology*, **129**, 2867-2874.

Rivard, N., Rydzewska, G., Boucher, C., Lods, J.-S., Calvo, E., et Morisset, J. (1994) Cholecystokinin activation of tyrosine kinases, PtdInositol 3-kinase and phospholipase D : a role in pancreas growth induction. *Endocrine J.*, **2**, 393-401.

Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J., et Pouyssegur, J. (1996) Abrogation of p27<sup>Kip1</sup> by cDNA antisens supresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18337-18341.

Rivard, N., Boucher, M.-J., Asselin, C., et L'Allemain, G. (1999) MAP kinase cascade is required for p27 down-regulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **277**, sous presse.

Robinson, M.J., et Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 180-186.

Robinson, M.J., Stippec, S.A., Goldsmith, E., White, M.A., et Cobb, M.H. (1998) A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr. Biol.*, **8**, 1141-1150.

Rohan, P.J., Davis, P., Moskaluk, C.A., Kearns, M., Krutzsch, H., Siebenlist, U. et Kelly, K. (1993) PAC-1 : a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science*, **259**, 1763-1766.

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Limazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., et Nebresa, A.R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, **78**, 1027-1037.

Rozé, C. (1998) Physiologie du pancréas exocrine. Dans *Exploration de la sécrétion pancréatique exocrine*. Éditions Médicales Internationales, France, pp.11-90.

Ruvolo, P.P., Deng, X., Ito, T., Carr, B.K., et May, W.S. (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20296-20300.

Sadoul, R., Fernandez, P.A., Quiquerez, A.L., Martinou, I., Maki, M., Schroter, M., Becherer, J.D., Irmeler, M., Tschopp, J., et Martinou, J.C. (1996) Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J.*, **15**, 3845-3852.

Salvesen, G.S., et Dixit, V.M. (1997) Caspases : intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, **91**, 443-446.

Sandhue, C., Garbe, J., Bhattacharya, N., Daksis, J., Pan, C.-H., Yasmen, P., Koh, J., Slingerland, J.M., et Stampfer, M.R. (1997) Transforming growth factor  $\beta$  stabilizes p15<sup>INK4B</sup> protein, increased p15<sup>INK4B</sup>-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2458-2467.

Sangfelt, O., Erickson, S., Einhorn, S., et Grander, D. (1997) Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Oncogene*, **14**, 415-423.

Sarfati, P., Genik, P., et Morisset, J. (1985) Caerulein and secretin induced pancreatic growth : a possible control by endogenous pancreatic somatostatin. *Regul. Pept.*, **11**, 261-273.

Sawaoka, H., Kawano, S., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Takei, Y., Nagano, K., et Hori, M. (1998) Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am. J. Physiol.*, **274**, G1061-G1067.

Scheid, M.P., et Duronio, V. (1998) Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt : involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7439-7444.

Schönwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J., et Parker, P.J. (1998) Activation of the Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 790-798.

Seamon, K.B., et Daly, J.W. (1986) Forskolin : its biological and chemical properties. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.*, **20**, 1-150.

Seger, R., Ahn, N.G., Posada, J., Munar, E.S., Jensen, A.M., Cooper, J.A., Cobb, M.H., et Krebs, E.G. (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 14373-14381.

Selvakumaran, M., Lin, H.K., Miyashita, T., Wang, H.G., Krajewski, S., Reed, J.C., Horrmann, B., et Liebermann, D. (1994) Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1 : a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*, **9**, 1791-1798.

Serrano, M., Hannon, G.J., et Beach, D. (1993) A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk4. *Nature*, **366**, 704-707.

Serrano, M., Lee, H.W., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., et DePinho, R.A. (1996) Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*, **85**, 27-37.

Seth, A., Gonzalez, F.A., Gupta, S., Raden, D.L., et Davis, R.J. (1992) Signal transcription within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24796-24804.

Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M. et Clurman, B.E. (1997) Cyclin E-cdk2 is a regulator of p27kip1. *Genes Dev.*, **11**, 1464-1478.

Sherr, C.J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, **73**, 1059-1065.

Sherr, C.J. (1994) G1 phase progression : cycling on cue. *Cell*, **79**, 551-555.

Sherr, C.J., et Roberts, J.M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*, **9**, 1149-1163.

Sherr, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**, 1672-1677.

Singh, R.P., Dhawan, P., Golden, C., Kapoor, G.S., et Mehta, K.D. (1999) One-way cross-talk between p38<sup>MAPK</sup> and p42/p44<sup>MAPK</sup>. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19593-19600.

Slansky, J.E., Li, Y., Kaelin, W.G., et Farhnam, P.J. (1993) A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1610-1618.



Slingerland, J.M., Hengst, L., Pan, C.H., Alexander, D., Stampfer, M.F., et Reed, S.I. (1994) A novel inhibitor of cyclin-cdk activity detected in transforming growth factor  $\beta$ -arrested epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3683-3694.

Smith, C.A., Farrah, T., et Goodwin, R.G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins : activation, costimulation, and death. *Cell*, **76**, 959-962.

Solomon, T.E., Vanier, M., et Morisset, J. (1983) Cell site and time course of DNA synthesis in pancreas after caerulein and secretin. *Am. J. Physiol.*, **245**, G99-G105.

Steinman, R.A., Hoffman, B., Iro, C., Guillouf, C., Lieberman, D.A., et El-Houseini, M.E. (1994) Induction of p21(WAF-1/CIP1 during differentiation. *Oncogene*, **9**, 3683-3694.

Sun, H., Charles, C.H., Lau, L.F., et Tonks, N.K. (1993) MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*, **75**, 487-493.

Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsh, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., et Kroemer, G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.*, **184**, 1331-1341.

Susin, S.A., Lorenza, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., et Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.

Sutor, S.L., Vroman, B.T., Armstrong, E.A., Abraham, R.T., et Karnitz, L.M. (1999) A phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway that differentially regulated c-Raf and A-Raf. *J.Biol. Chem.*, **274**, 7002-7010.

Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A., et Reed, J.C. (1995) Cloning and functional analysis of BAG-1 : a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, **80**, 279-284.

Takeda, Y., et Escribano, M.J. (1991) Effects of insulin and somatostatin on the growth and the colony formation of two human pancreatic cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **117**, 416-420.

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., Elliston, K.O., Ayala, J.M., Casano, F.J., Chin, J., Ding, G.J.-F., Egger, L.A., Gaffney, E.P., Limjuco, G., Palyha, O.C., Raju, S.M., Rolando, A.M., Salley, J.P., Yamin, T.-T., Lee, T.D., Shively, J.E., MacCross, M., Mumford, R.A., Schimdt, J.A., et Tocci, M.J. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1-beta processing in monocytes. *Nature*, **356**, 768-774.

Thornberry, N.A., et Lazebnik, Y. (1998) Caspases : Enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.

Todd, J.L., Tanner, K.G., et Denu, J.M. (1999) Extracellular regulated kinases (ERK) 1 and ERK2 are authentic substrates for the dual-specificity protein-tyrosine phosphatase VHR. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13271-13280.

Townsend, K.J., Trusty, J.L., Traupman, M.A., Eastman, A., et Craig, R.W. (1998) Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C. *Oncogene*, **17**, 1223-1234.

Townsend, K.J., Zhou, P., Qian, L., Bieszczad, C.K., Lowrey, C.H., Yen, A., et Craig, R.W. (1999) Regulation of MCL1 through a serum response factor/ELK-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the BCL2 family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1801-1813.

Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 205-215.

Tsuji, M., et DuBois, R.N. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, **83**, 493-501.

Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Grenn, D.R., et Verma, I.M. (1996) Suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science*, **274**, 787-789.

Vaux, D.L., et Strasser, A. (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 2239-2244.

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., et Vandenabeele, P. (1998) Dual signaling of the Fas receptor :

initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.*, **188**, 919-930.

Viguerie, N., Tahiri-Jouti, N., Ayrat, A.M., Cambillau, C., Scemama, J.L., Bastie, M.J., Knuhtsen, S., Esteve, J.P., Pradayrol, L., Susini, C. et Vaysse, N. (1989) Direct inhibitory effects of a somatostatin analog, SMS 201-995, on AR4-2J cell proliferation via pertussis toxin-sensitive guanosine triphosphate-binding protein-independent mechanism. *Endocrinology*, **124**, 1017-1025.

Villanueva, A., Garcia, C., Paules, A.B., Vicente, M., Megias, M., Reyes, G., de Villalonga, P., Agell, N., Lluís, F., Bachs, O., et Capella, G. (1998) Disruption of the antiproliferative TGF- $\beta$  signalling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene*, **17**, 1969-1978.

Vlach, J., Hennecke, S., et Amati, B. (1997) Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.*, **16**, 5334-5344.

Voice, J.K., Klemke, R.L., Le, A., et Jackson, J.H. (1999) Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17164-17170.

Von Schonfeld, J., Meisse, F., et Muller, M.K. (1995) Rat pancreas after long-term treatment with the somatostatin analogue octreotide. *Exp. Physiol.*, **80**, 1031-1038.

Vouret-Craviari, V., Van Obberghen Scilling, E., Scimeca, J.-C., Van Obberghen, E., et Pouyssegur, J. (1993) Differential activation of p44 MAPK (ERK1) by  $\alpha$ -thrombin and thrombin receptor peptide agonist. *Biochem. J.*, **289**, 209-214.

Walsh, D.A., Perkins, J.P., et Krebs, E.G. (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **243**, 3763-3765.

Wang, C.Y., Eshleman, J.R., Willson, J.K., et Markowitz, S. (1995) Both transforming growth factor-beta and substrate release are inducers of apoptosis in human colon adenoma cell line. *Cancer Res.*, **55**, 5101-5105.

Wang, C.-Y., Mayo, M.W., et Baldwin Jr, A.S. (1996) TNF- and cancer therapy-induced apoptosis : potentiation by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Science*, **274**, 784-787.

Wang, H.G., Takayama, S., Rapp, U.R., et Reed, J.C. (1996) Bcl-2 interacting protein, Bag-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7063-7068.

Wang, H.G., et Reed, J.C. (1998) Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. *Biofactors*, **8**, 13-16.

Wang, X., Gorospe, M., Huang, Y., et Holbrook, N.J. (1997) p27<sup>Kip1</sup> overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene*, **15**, 2991-2997.

Ward, Y., Gupta, S., Jensen, P., Wartmann, M., Davis, R.J., et Kelly, K. (1994) Control of MAP kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1. *Nature*, **367**, 651-654.

Weiser, R.J., Faust, D., Dietrich, C., et Oesch, F. (1999) p16<sup>INK4</sup> mediates contact-inhibition of growth. *Oncogene*, **17**, 277-281.

Wilson, K.P., Black, J.F., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia M.A., Murcko M.A., Chambers S.P., Aldape R.A., Raybuck S.A., et al. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1- $\beta$ -converting enzyme. *Nature*, **370**, 270-275.

Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M.J., et Sturgill, T.W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*, **262**, 1065-1069.

Wu, J., Lau, L.F., et Sturgill, T.W. (1994) Rapid deactivation of MAP kinase in PC12 cells occurs independently of induction of phosphatase MKP-1. *FEBS Lett.*, **353**, 9-12.

Xia, Z.G., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., et Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-P38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, **270**, 1326-1331.

Yan, C.Y.I., et Greene, L.A. (1998) Prevention of PC12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the Ras pathway. *J. Neurosci.*, **18**, 4042-4049.

Yang, B.-S., Hauser, C.A., Henkel, G., Colman, M.S., Van Beveren, C., Stacey, K.J., Hume, D.A., Maki, R.A., et Ostrowski, M.C. (1996) Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activity of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 538-547.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.-I., Jones, D.P., et Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2 : release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.

Yao, R., et Cooper, G.M. (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*, **267**, 2003-2006.

Yu, S.J., Boudreau, F., Desilets, A., Houde, M., Rivard, N., et Asselin, C. (1999) Attenuation of haptoglobin gene expression by TGFbeta requires the MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 544-549.

Yunis, A.A., Arimura, G.K., et Russin, D.J. (1977) Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture : sensitivity to asparaginase. *Int. J. Cancer*, **19**, 218-235.

Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsh, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., et Kroemer G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.*, **183**, 1533-1544.

Zarkowska, T., et Mitnacht, S. (1997) Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12738-12746.

Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S.J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X. *Cell*, **87**, 619-628.

Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M.H., et Goldsmith, E.J. (1994) Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature*, **368**, 704-711.

Zhang, H., Hannon, G.J., et Beach, D. (1994) p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.*, **8**, 1750-1758.

Zhao, J., Dynlacht, B., Imai, T., Hori, T., et Harlow, E. (1998) Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2 promotes S-phase entry. *Genes Dev.*, **12**, 456-461.

Zheng, C.F., et Guan, K.L. (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J.*, **13**, 1123-1231.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., et Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-413.

Zou, H., Yuchen, L., Liu, X., et Wang, X. (1999) An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.*, **274**, 11549-11556.